

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 833 099**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01)	A61K 47/18	(2007.01)
A61K 47/12	(2006.01)		
C07K 14/00	(2006.01)		
C07K 16/00	(2006.01)		
A61K 38/26	(2006.01)		
A61K 47/26	(2006.01)		
A61P 3/10	(2006.01)		
A61P 3/04	(2006.01)		
A61P 3/08	(2006.01)		
A61K 9/08	(2006.01)		

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2016 PCT/CN2016/073279**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16127887**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2016 E 16748688 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2020 EP 3257524**

(54) Título: **Preparación de disolución estabilizada de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R farmacéutica**

(30) Prioridad:

11.02.2015 CN 201510071304

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

14.06.2021

(73) Titular/es:

GMAX BIOPHARM LLC (100.0%)
3F, Building 2, 288 Qiuyi Road, Binjiang District
Hangzhou, 310052, CN

(72) Inventor/es:

ZHANG, CHENG;
ZHANG, HUA;
FAN, KESUO;
GUO, YONG y
JING, SHUQIAN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 833 099 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

Preparación de disolución estabilizada de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R farmacéutica

Campo

La presente invención se refiere al campo técnico de las biomedicinas y, en especial, se refiere a una formulación farmacéutica en disolución estable de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R.

Antecedentes

Los derivados de GLP-1 se usan en ensayos clínicos para tratar la diabetes de tipo II y la obesidad (Gallwitz B., Eur. Endocrinol., 2015, 11:21-5). El GLP-1 induce múltiples efectos biológicos, por ejemplo, la estimulación de la secreción de insulina, la inhibición de la secreción de glucagón, la inhibición del vaciado gástrico, la inhibición del movimiento gástrico e intestinal, así como la inducción de la pérdida de peso corporal (Lund A. et al., Eur. J. Intern. Med., 2014, 25:407-14). Una característica destacada del GLP-1 es su capacidad para estimular la secreción de insulina sin el riesgo de inducir hipoglucemia, que es uno de los problemas del tratamiento con insulina y algunas otras terapias orales que estimulan la secreción endógena de insulina. El GLP-1 endógeno se degrada con mucha rapidez y su semivida extremadamente corta limita la eficacia del GLP-1 como péptido terapéutico.

En la actualidad, existen varias maneras de prolongar la semivida del GLP-1 y sus derivados y, al mismo tiempo, mantener su actividad biológica (Verspohl E.J., Pharmacol. Rev., 2012, 64:A-AX), que incluyen la fusión de GLP-1 y sus derivados con un fragmento Fc de IgG o la albúmina de suero humana ("human serum albumin", HSA). El nuevo método que han elegido los inventores consiste en fusionar el GLP-1 con un anticuerpo anti-GLP-1R de longitud entera (IgG). La IgG puede extender la semivida *in vivo* de su compañero de fusión, y su propia semivida en seres humanos es de 21 días. Además de mantener la actividad biológica del GLP-1, una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R tiene una estabilidad ventajosa proporcionada por el resto IgG. Al mismo tiempo, el resto IgG proporciona a la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R propiedades de localización molecular, aumentando de esta manera la posibilidad de que se produzcan interacciones entre el GLP-1 y el GLP-1R. Además, la molécula de anticuerpo tiene una inmunogenicidad más baja que la mayoría de otros compañeros de fusión que se emplean habitualmente. Es necesario que un fármaco de uso a largo plazo o, incluso, de uso durante toda la vida, tenga una inmunogenicidad baja.

A menudo, las proteínas de fusión son producidas por líneas celulares de mamífero, por ejemplo, CHO, SP2/0 o NSO. En la presente invención se indica que, cuando se usan células CHO para producir una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, la proteína de fusión se somete a una degradación por proteasas endógenas o bajo ciertas condiciones fisicoquímicas de cultivo celular. El proceso de degradación es más rápido y más evidente en condiciones de pH bajo y, por encima de esto, la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es más propensa a la agregación cuando el pH es mayor que 7. Además, en la presente invención se descubrió que, bajo condiciones de refrigeración (2-8 °C) y en una disolución de un único tampón (por ejemplo, un sistema de tampón citrato), la solubilidad de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es demasiado baja para cumplir los requisitos para las dosificaciones terapéuticas. En la presente invención, los problemas mencionados anteriormente se resuelven mediante el control del pH, usando una combinación específica de ciertos excipientes y una concentración específica de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R.

Sumario

El objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica en disolución estable de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, y la formulación es estable con una semivida *in vivo* larga y es eficaz, y puede usarse para el tratamiento de la diabetes, la obesidad y enfermedades relacionadas.

Para resolver los problemas técnicos mencionados anteriormente, la presente invención proporciona las siguientes soluciones técnicas.

Una formulación farmacéutica en disolución estable de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, un aminoácido, un tensioactivo y un sistema tampón, en la que la concentración final del aminoácido es de 100-180 mM, la concentración final del tensioactivo es del 0,05 %-0,15 %, y el pH de la formulación en disolución estable es de 5,0 a 8,0; en la que el aminoácido es arginina y el tensioactivo es TWEEN-80.

Para solucionar los problemas consistentes en que una formulación en disolución de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es inestable a pH bajo y se agrega con facilidad a pH alto, y la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R no tiene la suficiente estabilidad en una disolución de un único tampón, la presente invención proporciona una formulación fisicoquímicamente estable que comprende una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, y comprende además un sistema tamponante, un aminoácido como estabilizante y osmorregulador, y un tensioactivo. La formulación en disolución estable es estable durante al menos 6 meses a 25 °C. Preferiblemente, la formulación en disolución estable de la presente invención comprende la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a la concentración final de aproximadamente 0,1-100 mg/ml, un tampón citrato a la concentración de 5-30

5 mM, TWEEN-80 a la concentración final del 0,05 %-0,15 %, y L-arginina a la concentración final de 100-180 mM, en la que el pH es de 5 a 8. La formulación en disolución estable potencia la solubilidad de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R y su estabilidad bajo circunstancias especiales, en especial a altas temperaturas. La presente invención también incluye una formulación en disolución estable para su uso en un método para tratar la diabetes, la obesidad y enfermedades relacionadas, que comprende administrar la formulación de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R de la presente invención.

Preferiblemente, la concentración final del aminoácido es de 100-180 mM, la concentración final del tensioactivo es del 0,05 %-0,15 %, y el sistema tampón es un tampón citrato, y el pH de la formulación en disolución estable es de 5,5 a 7,0.

10 Preferiblemente, la concentración del tampón citrato es de 5-30 mM.

Preferiblemente, el aminoácido es L-arginina, la concentración final de la L-arginina es de 100-180 mM, el tensioactivo es TWEEN-80, y la concentración final de TWEEN-80 es del 0,05 %-0,15 %.

Preferiblemente, la concentración final de la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es de 0,1 mg/ml-100 mg/ml.

15 Preferiblemente, la concentración final de la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es de 5 mg/ml-40 mg/ml.

20 Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R se selecciona de SEC ID NO:1, SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, y la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada se selecciona de SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9.

25 Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena ligera de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es SEC ID NO:10 o SEC ID NO:11, y la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada es SEC ID NO:12.

30 La proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R de la presente invención comprende GLP-1, o uno de sus análogos, que se fusiona en su extremo C-terminal al extremo N-terminal de la cadena ligera de un anticuerpo de GLP-1R a través de un conector peptídico. La proteína de fusión de un anticuerpo tiene una actividad biológica similar o mejorada y una semivida extendida comparada con GLP-1 y sus análogos. La secuencia del dominio variable de cadena ligera de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R preferida comprende toda o parte de SEC ID NO:1, 2, 3, 4, 5 o 6, la secuencia del dominio constante de cadena ligera comprende toda o parte de SEC ID NO:10 o 11, la secuencia del dominio variable de cadena pesada comprende toda o parte de SEC ID NO:7, 8 o 9, y la secuencia del dominio constante de cadena pesada comprende toda o parte de SEC ID NO:12. La secuencia del dominio variable de cadena ligera de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R más preferida es sustancialmente SEC ID NO:1, 2, 3, 4, 5 o 6, la secuencia del dominio constante de cadena ligera es sustancialmente SEC ID NO:7, 8 o 9, y la secuencia del dominio constante de cadena pesada es sustancialmente SEC ID NO:12. La secuencia del dominio variable de cadena ligera de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R más preferida de todas es SEC ID NO:1, 2, 3, 4, 5 o 6, la secuencia del dominio constante de cadena ligera es SEC ID NO:10 o 11, la secuencia del dominio variable de cadena pesada es SEC ID NO:7, 8 o 9, y la secuencia del dominio constante de cadena pesada es SEC ID NO:12.

35 40 La formulación en disolución estable de la presente invención puede usarse para tratar la diabetes o la obesidad.

La formulación en disolución estable de la presente invención puede usarse para tratar el síndrome del intestino irritable y otras enfermedades que se benefician de una disminución de la glucosa en plasma, la inhibición del movimiento gástrico y/o del intestino, la inhibición del vaciado gástrico y/o intestinal, o la inhibición de la ingesta de alimentos.

45 50 Los efectos beneficiosos de la presente invención son: estabilidad, una semivida *in vivo* larga, buena eficacia, e idoneidad para el tratamiento de la diabetes, la obesidad, el síndrome del intestino irritable y enfermedades relacionadas.

Descripción detallada

A través de las siguientes realizaciones específicas, las soluciones técnicas de la presente invención se ilustran más a fondo.

En esta invención, a menos que se indique específicamente, las materias primas e instrumentos y similares empleados están todos disponibles en el mercado o se emplean habitualmente en la técnica. Los métodos de las siguientes realizaciones, si no se indican específicamente, son todos métodos convencionales en la técnica.

La preparación de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R de la presente invención se describe en una solicitud de patente anterior: CN104371019A, WO 2015/021871.

La actividad biológica se refiere a la capacidad de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R para unirse y activar el GLP-1R *in vivo* para suscitar una respuesta. Las respuestas incluyen, pero no se limitan a la estimulación

5 de la secreción de insulina, la inhibición de la secreción de glucagón, la inhibición del apetito, la inducción de la pérdida de peso, la inducción de la saciedad, la inhibición de la apoptosis de células β pancreáticas y la inducción de la proliferación de células β pancreáticas.

La formulación farmacéutica en disolución estable de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R comprende la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R en un tampón, que comprende además un aminoácido como estabilizante y osmorregulador, y un tensioactivo. A 25 °C, la formulación en disolución estable es estable durante al menos 6 meses, y a 25 °C, más concretamente, la formulación en disolución estable es estable durante 6 meses a 8 meses, durante 6 meses a 12 meses, durante 6 meses a 18 meses, durante 6 meses a 24 meses, durante 8 meses a 12 meses, durante 8 meses a 18 meses, durante 8 meses a 24 meses, durante 12 meses a 18 meses, durante 12 meses a 24 meses, durante 18 meses a 24 meses.

10 15 El sistema tampón usado en la presente invención incluye, pero no se limita a uno o varios de los siguientes compuestos orgánicos o inorgánicos: ácido cítrico, sales del ácido cítrico, ácido ascórbico, sales del ácido ascórbico, ácido glucónico, sales del ácido glucónico, ácido carbónico, sales del ácido carbónico, ácido tartárico, sales del ácido tartárico, ácido succínico, sales del ácido succínico, ácido acético, sales del ácido acético, ácido ftálico, sales del ácido ftálico, ácido fosfórico, fosfato, ácido clorhídrico, Tris, tometamina, y un aminoácido, que incluye, pero no se limita a histidina, arginina, glicina.

20 25 25 El osmorregulador, tal como se define en la presente invención, es una sustancia capaz de aumentar la presión osmótica de una formulación tras su adición. Los osmorreguladores son aminoácidos libres que incluyen, pero no se limitan a arginina, histidina, metionina, lisina, ornitina, leucina, isoleucina, alanina, glicina, ácido glutámico y ácido aspártico. El aminoácido básico es preferiblemente arginina, histidina, lisina o sus combinaciones. El aminoácido usado en la presente invención es arginina. El aminoácido puede añadirse en forma de una sal de un aminoácido, en el que el aminoácido añadido puede ser un D-aminoácido, tal como D-arginina, o un L-aminoácido, tal como L-arginina.

30 35 El aminoácido añadido no se limita a actuar solo como un osmorregulador, sino que, al mismo tiempo, también es un estabilizante, e incluye, pero no se limita a arginina, histidina, metionina, lisina, ornitina, leucina, isoleucina, alanina, glicina, glutamina, ácido glutámico, asparagina, ácido aspártico, fenilalanina, tirosina, serina, prolina y triptófano. Preferiblemente, la concentración del aminoácido como estabilizante y osmorregulador es de 1 a 500 mM.

40 45 50 55 60 Los tensioactivos, según se definen en la presente invención, son compuestos orgánicos anfifílicos, es decir, compuestos que contienen grupos que tienen diferentes propiedades solubles. Generalmente, estos compuestos contienen grupos hidrocarburos lipófilos y grupos iónicos hidrófilos. Los tensioactivos incluyen, pero no se limitan a ésteres de ácido graso de sorbitano, por ejemplo, monocaprilato de sorbitano, monolaurato de sorbitano, monopalmitato de sorbitano, trioleato de sorbitano; ésteres de ácido graso de glicerina, por ejemplo, monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina, monoestearato de glicerina; ésteres de ácido graso de poliglicerina, por ejemplo, monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo, monolinoleato de decaglicerilo; ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano, por ejemplo, monolaurato de polioxietilensorbitano, en el que el monolaurato de polioxietilensorbitano (20) es TWEEN-20, y el monopalmitato de polioxietilensorbitano es TWEEN-40, monooleato de polioxietilensorbitano, en el que el monooleato de polioxietilensorbitano (80) es TWEEN-80, monoestearato de polioxietilensorbitano, en el que el monoestearato de polioxietilensorbitano (60) es TWEEN-60, el trioleato de polioxietilensorbitano es TWEEN-85, y el triestearato de polioxietilensorbitano es TWEEN-65; ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitol, por ejemplo, tetraestearato de polioxietilensorbitol, tetraoleato de polioxietilensorbitol; ésteres de ácido graso de polioxietilenglicerina, por ejemplo, ésteres de ácido graso de glicerina, por ejemplo, monoestearato de polioxietilenglicerilo; ésteres de ácido graso de polietilenglicol, por ejemplo, diestearato de polietilenglicol; polioxietileno alquil éteres, por ejemplo, polioxietileno lauril éter; polioxietileno polioxipropilenalquílicos, por ejemplo, polioxietileno polioxipropilenglicol, polioxietileno polioxipropilenpropil éter, polioxietileno polioxipropilencetil éter; polioxietileno alquilfenil éteres, por ejemplo, polioxietileno nonilfenil éter; aceites de ricino hidrogenados de polioxietileno, por ejemplo, aceite de ricino de polioxietileno, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno; derivados de cera de abeja de polioxietileno, por ejemplo, cera de abeja de polioxietilensorbitol; derivados de lanolina de polioxietileno, por ejemplo, polioxietilenlanolina; y amidas de ácido graso de polioxietileno, por ejemplo, amida de ácido esteárico de polioxietileno; sulfatos de alquilo C10-C18, por ejemplo, cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, oleilsulfato de sodio; sulfato de éter de alquilo C10-C16 de polioxietileno con un promedio de 2 a 4 moles de unidades de óxido de etileno añadidas, por ejemplo, polioxietilenolaurilsulfato de sodio; y sales de ésteres de sulfosuccinato de alquilo C1-C18, por ejemplo, éster laurilsulfosuccinato de sodio, y tensioactivos naturales, tales como lecitina, glicerofosfolípido, esfingofosfolípidos, por ejemplo, esfingomielina, y ésteres de sacarosa de ácidos grasos C12-C18. El tensioactivo puede incluir uno o más de los tensioactivos descritos anteriormente. Los tensioactivos más adecuados son ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitano, por ejemplo, TWEEN-20, TWEEN-40, TWEEN-60 y TWEEN-80.

La formulación en disolución farmacéuticamente estable de una proteína de fusión de GLP-1R comprende la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a una concentración final de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg/ml. La concentración preferida (mg/ml) de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R varía de aproximadamente 0,1 a 1, de 1 a 5, de 5 a 10, de 5 a 20, de 10 a 20, de 20 a 30, de 20 a 40, de 30 a 40, de 40 a 50, de 50 a 60, de 60 a 70, de 70 a 80, de 80 a 90, de 90 a 100 mg/ml. Más preferiblemente, la concentración (mg/ml) de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es de aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,25, aproximadamente 0,5, aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6,5, aproximadamente 8, aproximadamente 10, aproximadamente 12,5, aproximadamente 15, aproximadamente 17,5, aproximadamente 20, aproximadamente 22,5, aproximadamente 25, aproximadamente 27,5, aproximadamente 30, aproximadamente 32,5, aproximadamente 35, aproximadamente 37,5, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100 mg/ml.

15 El sistema tampón preferido de la formulación en disolución estable es una sal citrato a una concentración que varía de aproximadamente 5 a 30 mM. Más preferiblemente, la concentración de citrato (mM) varía de aproximadamente 5 a 25, de 5 a 20, de 5 a 15, de 5 a 12,5, de 5 a 10, de 7,5 a 30, de 7,5 a 25, de 7,5 a 20, de 7,5 a 15, de 7,5 a 12,5, de 7,5 a 10, de 8 a 30, de 8 a 25, de 8 a 20, de 8 a 15, de 8 a 12,5, de 8 a 11, de 8 a 10, de 9 a 30, de 9 a 25, de 9 a 20, de 9 a 15, de 9 a 12,5, de 10 a 30, de 10 a 25, de 10 a 20, de 10 a 17,5, de 10 a 15, de 10 a 12,5, de 12,5 a 30, de 12,5 a 25, de 12,5 a 20, de 12,5 a 15, de 15 a 30, de 15 a 25, de 15 a 20, de 17,5 a 30, de 17,5 a 25, de 17,5 a 22,5, de 17,5 a 20, de 20 a 30, de 20 a 27,5, de 20 a 25, de 20 a 22,5, de 22,5 a 30, de 22,5 a 27,5, de 22,5 a 25, de 25 a 30, de 25 a 27,5, de 27,5 a 30. Otra concentración de citrato preferida es de aproximadamente 5 a 20 mM. Una concentración de citrato particularmente preferida es de aproximadamente 10, 10,0, 20 o 20,0 mM.

25 El pH de la formulación farmacéutica en disolución estable de la proteína de fusión de GLP-1R de la presente invención varía de aproximadamente 5 a 8. El intervalo de pH proporciona una estabilidad aceptable a la formulación para mantener la solubilidad de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R y para estimular la actividad de estimulación de la secreción de insulina, y es adecuado para la administración parenteral. El pH puede ajustarse al pH deseado añadiendo un ácido, por ejemplo, HCl, o añadiendo una base, por ejemplo, NaOH, o mediante una combinación de un tampón citrato y ácido cítrico para lograr la concentración de tampón y el valor de pH deseados.

30 Los intervalos de pH preferidos varían de 5 a 7,75, de 5 a 7,5, de 5 a 7,25, de 5 a 7,0, de 5 a 6,75, de 5 a 6,5, de 5 a 6,25, de 5 a 6,0, de 5 a 5,75, de 5 a 5,5, de 5 a 5,25, de 5,25 a 8,0, de 5,25 a 7,75, de 5,25 a 7,5, de 5,25 a 7,25, de 5,25 a 7,0, de 5,25 a 6,75, de 5,25 a 6,5, de 5,25 a 6,25, de 5,25 a 6,0, de 5,25 a 5,75, de 5,25 a 5,5, de 5,5 a 8,0, de 5,5 a 7,75, de 5,5 a 7,5, de 5,5 a 7,25, de 5,5 a 7,0, de 5,5 a 6,75, de 5,5 a 6,5, de 5,5 a 6,25, de 5,5 a 6,0, de 5,5 a 5,75, de 5,75 a 8,0, de 5,75 a 7,75, de 5,75 a 7,5, de 5,75 a 7,25, de 5,75 a 7,0, de 5,75 a 6,75, de 5,75 a 6,5, de 5,75 a 6,25, de 5,75 a 6,0, de 6,0 a 8,0, de 6,0 a 7,75, de 6,0 a 7,5, de 6,0 a 7,25, de 6,0 a 7,0, de 6,0 a 6,75, de 6,0 a 6,5, de 6,0 a 6,25, de 6,25 a 8,0, de 6,25 a 7,75, de 6,25 a 7,5, de 6,25 a 7,25, de 6,25 a 7,0, de 6,25 a 6,75, de 6,75 a 8,0, de 6,75 a 7,75, de 6,75 a 7,5, de 6,75 a 7,25, de 6,75 a 7,0, de 7,0 a 8,0, de 7,0 a 7,75, de 7,0 a 7,5, de 7,0 a 7,25, de 7,25 a 8,0, de 7,25 a 7,5, de 7,5 a 8,0, de 7,5 a 7,75, de 7,75 a 8,0. El pH más preferido varía de 6 a 7, y el pH particularmente preferido es de aproximadamente 6,5 o 6,50.

La presente descripción utiliza preferiblemente L-arginina como osmorregulador y estabilizante para la formulación farmacéutica en disolución estable de la proteína de fusión de GLP-1R a una concentración que varía de 1 a 500 mM para estabilizar la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R y para aumentar la solubilidad, y para ajustar la presión osmótica de la formulación de forma que sea adecuada para la administración parenteral y similares. La concentración de L-arginina preferida varía de 80 a 200 mM. La concentración más preferida varía de 80 a 190, de 80 a 180, de 80 a 170, de 80 a 160, de 80 a 150, de 80 a 140, de 80 a 130, de 80 a 120, de 80 a 110, de 80 a 100, de 80 a 90, de 90 a 200, de 90 a 190, de 90 a 180, de 90 a 170, de 90 a 160, de 90 a 150, de 90 a 140, de 90 a 130, de 90 a 120, de 90 a 110, de 90 a 100, de 100 a 200, de 100 a 190, de 100 a 180, de 100 a 170, de 100 a 160, de 100 a 150, de 100 a 140, de 100 a 130, de 100 a 120, de 100 a 110, de 100 a 200, de 100 a 190, de 100 a 180, de 100 a 170, de 100 a 160, de 100 a 150, de 100 a 140, de 100 a 130, de 100 a 120, de 100 a 110, de 100 a 100, de 120 a 200, de 120 a 190, de 120 a 180, de 120 a 170, de 120 a 160, de 120 a 150, de 120 a 140, de 120 a 130, de 130 a 200, de 130 a 190, de 130 a 180, de 130 a 170, de 130 a 160, de 130 a 150, de 130 a 140, de 140 a 200, de 140 a 190, de 140 a 180, de 140 a 170, de 140 a 160, de 140 a 150, de 150 a 200, de 150 a 190, de 150 a 180, de 150 a 170, de 150 a 160, de 160 a 200, de 160 a 190, de 160 a 180, de 160 a 170, de 170 a 200, de 170 a 190, de 170 a 180, de 180 a 190, de 190 a 200. Una concentración más preferida de L-arginina es de 100 a 180 mM. Una concentración particularmente preferida es de aproximadamente 138 mM o de aproximadamente 138.0 mM.

60 La presente descripción utiliza preferiblemente TWEEN-80 como tensioactivo para la formulación farmacéutica en disolución estable de una proteína de fusión de GLP-1R a una concentración que varía del 0,01 % al 0,5%. La concentración preferida de TWEEN-80 varía de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,2 %, y el intervalo de concentración preferido se determina mediante la combinación de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R y arginina, de modo que se minimiza la formación de agregados solubles y de partículas insolubles. La concentración más preferida de TWEEN-80 varía de aproximadamente 0,01 % al 0,2 %, del 0,01 % al 0,15 %, del

0,01 % al 0,1 %, del 0,01 % al 0,05 %, del 0,01 % al 0,025 %, del 0,025 % al 0,2 %, del 0,025 % al 0,15 %, del 0,025 % al 0,1 %, del 0,025 % al 0,05 %, del 0,05 al 0,2 %, del 0,05 al 0,15 %, del 0,05 al 0,1 %, del 0,05 al 0,075 %, del 0,075 % al 0,2 %, del 0,075 % al 0,15 %, del 0,075 % al 0,1 %, del 0,1 % al 0,2 %, del 0,1 % al 0,15 %, del 0,15 % al 0,2 %. Una concentración más preferida de TWEEN-80 varía de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 0,15 %. Una concentración de TWEEN-80 particularmente preferida es de aproximadamente 0,1 %.

Una formulación farmacéutica en disolución estable particularmente preferida de una proteína de fusión de GLP-1R comprende una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a la concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/ml, un tampón citrato a la concentración de aproximadamente 20 mM, TWEEN-80 a la concentración de aproximadamente 0,1 %, L-arginina a la concentración de aproximadamente 138 mM, con un pH de aproximadamente 6,5. Otra formulación farmacéutica en disolución estable particularmente preferida de la proteína de fusión de GLP-1R comprende una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a la concentración que varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mg/ml, un tampón citrato a la concentración de aproximadamente 20 mM, TWEEN-80 a la concentración de aproximadamente 0,1 %, L-arginina a la concentración de aproximadamente 138 mM, con un pH de aproximadamente 6,5. Otra formulación farmacéutica en disolución estable particularmente preferida comprende una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a la concentración que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/ml, un tampón citrato a la concentración que varía de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,15 %, L-arginina a la concentración que varía de aproximadamente 100 a 180 mM, con un pH que varía de aproximadamente 6,0 a 7.

Otra formulación farmacéutica en disolución estable particularmente preferida comprende una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a la concentración que varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mg/ml, un tampón citrato a la concentración que varía de aproximadamente 0,05 a 0,15 %, L-arginina a la concentración que varía de aproximadamente 100 a 180 mM, con un pH que varía de aproximadamente 6,0 a 7. Otra formulación farmacéutica en disolución estable particularmente preferida comprende una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a la concentración que varía de aproximadamente 5 a 20 mM, TWEEN-80 a la concentración que varía de aproximadamente 0,05 a 0,15 %, L-arginina a la concentración que varía de aproximadamente 100 a 180 mM, con un pH que varía de aproximadamente 6,0 a 7.

La administración de la formulación en disolución estable puede realizarse mediante cualquier vía eficaz conocida por los médicos expertos en la técnica. La administración parenteral es uno de los métodos. En general, en la bibliografía médica se entiende que la administración parenteral consiste en inyectar una forma de dosificación en un individuo a través de una jeringa estéril o algún otro dispositivo mecánico, tal como una bomba de infusión. Las vías parenterales pueden incluir las vías intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. La administración subcutánea es la vía preferida.

La formulación en disolución estable de la presente invención puede usarse para tratar a un individuo con diabetes mellitus no dependiente de insulina o en progresión hacia una diabetes mellitus no dependiente de insulina, diabetes mellitus dependiente de insulina u obesidad. La cantidad eficaz de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R en la formulación en disolución estable descrita en la presente es una cantidad que provoca el efecto terapéutico y/o profiláctico deseado cuando se administra a un individuo que necesita la estimulación de GLP-1R sin provocar efectos secundarios indeseables.

Es preferible que las proteínas de fusión se administren una vez cada dos semanas o una vez semanal. Dependiendo de la enfermedad que se está tratando, puede ser necesario administrar la proteína de fusión con más frecuencia, tal como de dos a tres veces semanales.

La presente invención se describirá a continuación mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Realizaciones específicas de la invención

Se usó un ensayo de un gen indicador para determinar la activación *in vitro* de GLP-1R por una proteína de fusión de GLP-1.

Se sembraron células CHO-DHFR- que coexpresan hGLPIR-CRE-luciferasa en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a 20000 células por pocillo, y la placa se cultivó a 37 °C durante la noche. El sobrenadante del cultivo se retiró al día siguiente. Las células se lavaron dos veces con medio sin suero, y el líquido residual se retiró mediante succión. Después de añadir 100 µl de una muestra de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R que se había prediluido con medio sin suero o con un control, las células se incubaron a 37 °C durante 4 h. Después de la incubación, se añadieron 100 µl del sustrato de quimioluminiscencia BRIGHT-GLO™ (Promega). Por último, los lisados celulares se transfirieron a una placa blanca de 96 pocillos y se registraron las intensidades de luminiscencia relativa en un lector de microplacas SPECTRAMAX® L (Molecular Devices). Se analizaron las curvas de dosis-respuesta (intensidades de respuesta frente a concentraciones logarítmicas) usando GraphPad para determinar la CE50. Se usó una SEC-HPLC para analizar la pureza de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R.

Se usó una cromatografía de exclusión molecular ("size-exclusion chromatography", SEC-HPLC) para determinar la formación de agregados (agregados solubles) de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R y la pérdida de su forma monomérica. En un AGILENT 1100 HPLC a 25 °C, se enjuagó una columna de SEC de alta resolución TSK-G3000SWxl con tampón fosfato 200 mM (pH 6,8) como fase móvil hasta que la línea de base de la absorbancia de UV se mantuvo constante y estable. Se inyectó una formulación farmacéutica en disolución estable de una

5 proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a la concentración de 1-3 mg/ml (prediluida en la fase móvil) en la cantidad de 50 µl. La muestra se eluyó con la fase móvil a un caudal de 0,5 ml/min y se registró la absorbancia a UV 280 nm. Después de cada prueba, se calcularon las AUC ("area under curve", área bajo la curva) de los picos de absorbancia del monómero (el pico principal), los dímeros y los multímeros, se calculó el porcentaje de la AUC para el pico principal frente al AUC total, y se indicó como la pureza de la muestra.

Ejemplo 1: Efecto del pH sobre la estabilidad de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R

10 El pH puede afectar a la solubilidad y la estabilidad de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, y es uno de los parámetros más cruciales en la formulación. Se determinó el efecto del pH sobre la estabilidad de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R en el ejemplo 1 midiendo la cantidad de agregados solubles (dímeros y multímeros) formados, mediante la medición de la proporción de los agregados solubles formados (% de agregados) en cada muestra después de 1 semana o 3 semanas a 45 °C para determinar el efecto de cada pH específico sobre la estabilidad de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R.

15 Se prepararon formulaciones farmacéuticas en disolución estables de la proteína de fusión de GLP-1R según la tabla 1.

15 Tabla 1. Formulación de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a diferentes condiciones de pH

Proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, 4,5 mg/ml	pH	Tampón
1	6,5	PBS 0,1 M
2	7	PBS 0,1 M
3	7,5	PBS 0,1 M
4	8	PBS 0,1 M

20 Una formulación farmacéutica en disolución estable de una proteína de fusión de GLP-1R se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm. La disolución se conservó a 45 °C en viales de vidrio de borosilicato de 2 ml hasta su análisis o hasta 3 semanas. La proporción de agregados solubles en cada muestra se determinó mediante SEC-HPLC. Tal como se muestra en la tabla 2, la proporción de agregados solubles formada fue la más baja en el pH particularmente preferido de 6,5, y la estabilidad de la formulación fue la mejor; y la estabilidad tiende a aumentar a medida que disminuye el pH.

25 Tabla 2. Proporciones de agregados solubles formados en una formulación de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a diferentes condiciones de pH

Proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, 4,5 mg/ml	pH	Unidad	Momento (semana)	
			1	3
1	6,5	%	0,52	4,51
2	7,0	%	0,65	4,80
3	7,5	%	1,12	8,16
4	8,0	%	1,39	14,79

25 Ejemplo 2: Robustez de la formulación preferida

Se realizó un estudio de robustez con las formulaciones de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a una concentración de 10 mg/ml para estudiar si los errores ($\pm 15\%$) en los tres excipientes o factores más importantes (L-arginina, pH y TWEEN-80) tendrían un efecto significativo sobre la calidad y la estabilidad del fármaco en el proceso de producción real. Basándose en las reglas de formulación generales y en las propiedades de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, se eligieron los cambios en la pureza monomérica (es decir, el

porcentaje del pico principal) como criterio.

Se prepararon formulaciones de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R según la tabla 3 para los experimentos DOE.

Tabla 3. Formulaciones de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R para los experimentos DOE

Formulación	L-arginina (mM)	TWEEN-80 (%)	pH
DOE-1	110	0,05	7
DOE-2	110	0,15	6
DOE-3	166	0,05	6
DOE-4	166	0,15	7
Formulación preferida (repetición 1)	138	0,1	6,5
Formulación preferida (repetición 2)	138	0,1	6,5
DOE-5	110	0,15	7
DOE-6	110	0,05	6
DOE-7	166	0,15	6
DOE-8	166	0,05	7

5

Las formulaciones se prepararon y se esterilizaron mediante filtración a través de una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm. Las formulaciones se conservaron en un vial de vidrio de 2 ml a 40 °C hasta su análisis o hasta 1 mes. La pureza de cada formulación se determinó mediante SEC-HPLC. Tal como se muestra en la tabla 4, en el intervalo de pH 6 a 7, a una concentración de L-arginina de 110 a 166 mM y de TWEEN-80 del 0,05 % al 0,15 %, la pureza de cada formulación parece ser similar y no se aprecia una diferencia significativa, lo cual indica que la formulación preferida tiene una buena robustez y la desviación en la producción no debería afectar significativamente a la estabilidad de la formulación real.

10

Tabla 4. Purezas de las formulaciones de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R en los experimentos DOE

Formulación	Pureza (%)	Pureza (%)	Pureza (%)
	0 días	15 días	1 mes
DOE-1	99,76	96,18	95,94
DOE-2	99,77	95,59	95,34
DOE-3	99,75	96,42	96,20
DOE-4	99,75	94,43	94,10
Formulación preferida (repetición 1)	99,75	95,35	94,58
Formulación preferida (repetición 2)	99,75	95,84	94,88

Formulación	Pureza (%)	Pureza (%)	Pureza (%)
	0 días	15 días	1 mes
DOE-5	99,74	96,38	95,91
DOE-6	99,74	95,60	95,23
DOE-7	99,75	96,44	96,33
DOE-8	99,75	94,43	93,77

Ejemplo 3: Efecto de las concentraciones de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R sobre la estabilidad de la formulación

- 5 Se comparó la actuación de la formulación preferida a dos concentraciones diferentes de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R para determinar si la formulación preferida puede proporcionar una estabilidad aceptable a concentraciones mayores de proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R para facilitar el uso de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a una dosificación alta en la práctica. Se seleccionaron 10 y 20 mg/ml de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R para la comparación.

Se prepararon formulaciones de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R según la tabla 5.

- 10 Tabla 5. Formulaciones de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a diferentes concentraciones de proteína

n.º	Concentración de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R (mg/ml)	Concentración de citrato (mM)	L-arginina (mM)	TWEEN-80 (%)	pH
5	10	20	138	0,1	6,5
6	20	20	138	0,1	6,5

- 15 Las formulaciones se prepararon y se esterilizaron mediante filtración a través de una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm. Cada formulación se conservó a 37 °C en un vial de vidrio de 2 ml hasta su análisis o hasta 1 mes. Se determinó la pureza de cada formulación mediante SEC-HPLC, y se determinó su actividad biológica mediante el ensayo del gen indicador. Tal como se muestra en la tabla 6, la formulación preferida proporcionó una alta estabilidad a la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a una concentración de 20 mg/ml, y el cambio en su pureza a 37 °C fue similar a la de 10 mg/ml, solo con algunos cambios no significativos, y, al mismo tiempo, no se produjo una diferencia significativa con respecto a su actividad biológica.

- 20 Table 6. Pureza y actividad biológica de formulaciones de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R a diferentes concentraciones de proteína

n.º	Pureza (%)	Pureza (%)	Pureza (%)	Pureza (%)
	0 días	7 días	15 días	1 mes
5	98,3	98,2	97,6	96,7
6	96,6	96,85	96,5	96,05
n.º	Actividad (CE50)	Actividad (CE50)	Actividad (CE50)	Actividad (CE50)
	0 días	7 días	15 días	1 mes

n.º	Pureza (%)	Pureza (%)	Pureza (%)	Pureza (%)
	0 días	7 días	15 días	1 mes
5	0,1 nM	0,08 nM	0,09 nM	0,11 nM
6	0,06 nM	0,07 nM	0,08 nM	0,08 nM

Ejemplo 4: Estabilidad de la formulación preferida con vibración

Se realizó un estudio sobre la estabilidad de la formulación preferida en condiciones de vibración para investigar si la formulación puede proporcionar estabilidad a la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R en entornos vibrantes, para evaluar el efecto del transporte de la muestra y del traslado diario.

5 La formulación de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R se preparó según la tabla 7.

Tabla 7. Formulación de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R para la estabilidad bajo vibración

n.º	Concentración de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R (mg/ml)	Concentración de citrato (mM)	L-arginina (mM)	TWEEN-80 (%)	pH
7	10	20	138	0,1	6,5

10 Se preparó una formulación y se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm. la formulación se conservó en un vial de vidrio de 2 ml a 37 °C y se colocó sobre un agitador a una velocidad de 70 rpm hasta su análisis o hasta 15 días. Se determinó la pureza de cada formulación mediante SEC-HPLC, y se determinó la actividad biológica mediante el ensayo del gen indicador. Tal como se muestra en la tabla 8, la estabilidad y la actividad biológica de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R se mantuvieron bajo condiciones vibrantes.

15 Tabla 8. Pureza y actividad biológica de una formulación de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R bajo vibración

n.º	Pureza (%)				
	0 días	1 día	5 días	10 días	15 días
7	98,8	99,5	99,5	99,5	99,6
n.º	Actividad (CE50)				
	0 días	1 día	5 días	10 días	15 días
7	0,13 nM	0,13 nM	0,13 nM	0,14 nM	0,16 nM

Ejemplo 5: Estudio acelerado de la estabilidad de la formulación preferida

20 Se realizó un estudio acelerado de la estabilidad de la formulación preferida para examinar rápidamente la tendencia de los cambios en la estabilidad de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R en la formulación preferida a lo largo del tiempo.

La formulación de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R se preparó según la tabla 9.

Tabla 9. Formulación de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R para el estudio acelerado de la estabilidad

n.º	Concentración de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R (mg/ml)	Concentración de citrato (mM)	L-arginina (mM)	TWEEN-80 (%)	pH
8	10	20	138	0,1	6,5

La formulación se preparó y se esterilizó mediante filtración a través de una membrana de poli(difluoruro de vinilideno) (PVDF) de 0,22 µm. La formulación se conservó a 25 °C en un vial de vidrio de 2 ml hasta su análisis o hasta 6 meses. Se determinó la pureza de cada formulación mediante SEC-HPLC, y se determinó su actividad biológica mediante el ensayo del gen indicador. Tal como se muestra en la tabla 10, la formulación de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R soportó una temperatura de conservación de 25 °C durante al menos 6 meses sin cambios significativos en la pureza y la actividad biológica, mostrando una mejor estabilidad.

5

Tabla 10. Pureza y actividad biológica de una formulación de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R bajo condiciones aceleradas

n.º	Pureza (%)					
	0 meses	0,5 meses	1 mes	2 meses	4 meses	6 meses
8	98,4%	98,6%	98,8%	99,4%	97,6%	96,9%
n.º	Actividad (CE50)					
	0 meses	0,5 meses	1 mes	2 meses	4 meses	6 meses
8	0,17 nM	N/A	0,09 nM	0,08 nM	0,1 nM	0,05 nM

N/A = no ensayado.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> 9/4ÖÝºeÖE»ºÄpÉúlîÖ½Ö©¹º³jÓDÍP¹«E¾
 5 <120> Ö»ÖÖÖÓÄGLP-1Rj¹låÈÚºlµººxµÄÈ"ÈÜÖºÖÆ¹/4Ä
 <130> 2016.2.2
 10 <160> 12
 <170> PatentIn versión 3.3
 15 <210> 1
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <400> 1
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly
 20 25 30
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Ile Val
 35 40 45
 Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala
 50 55 60
 Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe
 65 70 75 80
 Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu
 85 90 95
 Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 100 105 110
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
 115 120 125
 Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu
 130 135 140
 Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 145 150 155
 20 <210> 2
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <400> 2
 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Ser Gly
 20 25 30
 Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Ala Thr Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser
 50 55 60
 Val Thr Pro Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser
 65 70 75 80
 Leu Leu Asn Ser Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 85 90 95
 Pro Gly Gln Pro Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe
 100 105 110
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 115 120 125
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 130 135 140
 Cys Phe Gln Ser Asn Tyr Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 145 150 155 160
 Val Glu Ile Lys
 <210> 3
 30 <211> 153

<212> PRT
 <213> Artificial

<400> 3

5 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ile Gln
 35 40 45
 Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val
 50 55 60
 Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Leu Leu Ala Trp
 65 70 75 80
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala
 85 90 95
 Ser Ser Leu Gln Ser Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 100 105 110
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe
 115 120 125
 Ala Ile Tyr Cys Cys Gln Gln Ala His Arg Phe Pro Pro Thr Phe Gly
 130 135 140
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg
 145 150

<210> 4

10 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 4

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Ser Gly
 20 25 30
 Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Ala Thr Gly Ser Ala Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
 50 55 60
 Ala Ser Ile Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asn
 65 70 75 80
 Ile Asn Asn Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 85 90 95
 Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Glu Val Pro Ser
 100 105 110
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 115 120 125
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Cys Cys Gln Gln Ala His
 130 135 140
 Arg Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg
 145 150 155 160

<210> 5

<211> 151

<212> PRT

20 <213> Artificial

<400> 5

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly
 20 25 30
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Ile Val
 35 40 45

Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala
 50 55 60
 Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Ile His Trp Tyr
 65 70 75 80
 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser
 85 90 95
 Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 100 105 110
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 115 120 125
 Val Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln
 130 135 140
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 145 150

<210> 6

<211> 158

5 <212> PRT

<213> Artificial

<400> 6

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Ser Gly
 20 25 30
 Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Gly Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser
 35 40 45
 Ala Thr Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 50 55 60
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Thr Tyr Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
 85 90 95
 Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg
 100 105 110
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg
 115 120 125
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
 130 135 140
 Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 145 150 155

10

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

15

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Phe Ile Ser Asn Leu Ser Tyr Arg Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Met Ala Pro Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 8
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Tyr Tyr Gly Leu
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 9

5 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial

<400> 9
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Met Ile Trp Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Leu Pro Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

10 Ser Ser

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

20 <210> 11

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 11

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
 1 5 10 15
 Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
 20 25 30
 Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val
 35 40 45
 Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
 50 55 60
 Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr
 65 70 75 80
 Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
 85 90 95
 Pro Thr Glu Cys Ser
 100

<210> 12

<211> 326

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una formulación farmacéutica en disolución estable de una proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R, un aminoácido, un tensioactivo y un sistema tampón, en la que la concentración final del aminoácido es de 100-180 mM, la concentración final del tensioactivo es del 0,05 %-0,15 %, y el pH de la formulación en disolución estable es de 5,0 a 8,0; en la que el aminoácido es arginina y el tensioactivo es TWEEN-80.
- 10 2.- La formulación en disolución estable de la reivindicación 1, en la que la formulación en disolución estable es estable durante al menos 6 meses a 25 °C.
- 15 3.- La formulación en disolución estable de la reivindicación 1, en la que el sistema tampón es un tampón citrato, y el pH de la formulación en disolución estable es de 5,5 a 7,0.
- 4.- La formulación en disolución estable de la reivindicación 3, en la que la concentración del tampón citrato es de 5-30 mM, preferiblemente 20 mM.
- 15 5.- La formulación en disolución estable de la reivindicación 3, en la que el aminoácido es L-arginina y la concentración final de L-arginina es de 120-150 mM, preferiblemente 138 mM.
- 6.- La formulación en disolución estable de la reivindicación 3, en la que la concentración final de TWEEN-80 es del 0,1 %.
- 7.- La formulación en disolución estable de la reivindicación 1, en la que la concentración final de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es de 0,1 mg/ml-100 mg/ml, preferiblemente de 5 mg/ml-40 mg/ml.
- 20 8.- La formulación en disolución estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R se selecciona de: SEC ID NO:1, SEC ID NO:2, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, y la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R se selecciona de: SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, y SEC ID NO:9.
- 25 9.- La formulación en disolución estable de la reivindicación 8, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena ligera de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es SEC ID NO:10 o SEC ID NO:11, y la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es SEC ID NO:12.
- 30 10.- La formulación en disolución estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la concentración de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es de 5 mg/ml-40 mg/ml, la concentración de L-arginina es de 138 mM, la concentración de TWEEN-80 es del 0,1 %, y el pH es de entre 6 y 7.
- 11.- La formulación en disolución estable de la reivindicación 10, en la que el pH es de aproximadamente 6,5.
- 12.- La formulación en disolución estable de la reivindicación 10, en la que la concentración de la proteína de fusión de un anticuerpo de GLP-1R es: 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, o 40 mg/ml.
- 35 13.- La formulación en disolución estable de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la formulación en disolución estable se conserva en una jeringa estéril.
- 14.- Una formulación farmacéutica en disolución estable según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en un método de tratamiento de la diabetes, la obesidad o el síndrome del intestino irritable.
- 40 15.- Una formulación farmacéutica en disolución estable según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en un método de tratamiento de la diabetes mellitus no dependiente de insulina o la diabetes mellitus dependiente de insulina.