



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2175834 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

Patentstyret

(45)	Oversettelse publisert:	2011.06.27
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet:	2011.02.23
(86)	Europeisk søknadsnr:	08772467.0
(86)	Europeisk innleveringsdag:	2008.07.09
(87)	Den europeiske søknadens publiseringsdato:	2010.04.21
(30)	Prioritet	2007.07.10 US 948855 P
(84)	Utpekte stater:	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater:	AL BA MK RS
(73)	Innehaver:	ELI LILLY AND COMPANY, Lilly Corporate Center, Indianapolis, IN 46285, USA
(72)	Oppfinner:	NG, Kingman, 10745 Putnam Place, Carmel, Indiana 46032, USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge
(54)	Benevnelse:	GLP-1-Fc-fusjonsproteinformulering
(56)	Anførte publikasjoner:	WO-A-2006/068910 B1

Beskrivelse

GLP-1-Fc-fusjonsproteinformulering

Oppfinnelsens område

5 Foreliggende oppfinnelse omhandler en kommersiell formulering av en glukagon-lignende peptidanalogue fusjonert til en Fc andel av et immunoglobulin. Denne formuleringen kan bli brukt for å behandle diabetes og overvekt så vel som et mangfold av andre tilstander eller forstyrrelser.

10 BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

Glukagonlignende peptid-1 (GLP-1) analoger og derivater ser lovende ut i kliniske forsøk for behandlingen av type 2 diabetes. GLP-1 induserer tallrike biologiske effekter så som stimulering av insulinsekresjon, inhibering av glukagonsekresjon, inhibering av magetømming, inhibering av gastrisk motilitet eller tarmmotilitet og indusering av vekttap. En signifikant karakteristikk av GLP-1 er dens
15 evne til å stimulere insulinsekresjon uten den assosierte risiko for hypoglykemi som er settnår en bruker insulinterapi eller noen typer av orale terapier som virker ved å øke insulinsekresjon.

20 Nytt av terapi som involverer GLP-1 peptider har blitt begrenset av det faktum at GLP-1(1-37) er svakt aktiv, og de to naturlig forekommende avkortede peptider, GLP-1(7-37)OH og GLP-1(7-36)NH₂, blir hurtig fjernet in vivo og har ekstremt korte in vivo halveringstider. Det er kjent at endogent produsert dipeptidylpeptidase IV (DPP-IV) inaktiverer sirkulerende GLP-1 peptider ved fjerning av de
25 N-terminale histidin- og alaninrester og er en hovedårsak for den korte in vivo halveringstiden.

Ulike tilnærmelser har blitt foretatt for å forlenge elimineringshalveringstiden for et GLP-1 peptid eller redusere fjerning av peptidet fra kroppen mens en opprettholder biologisk aktivitet. Én tilnærming involverer fusjonering av et GLP-1 peptid til Fc-andelen av et immunoglobulin. Immunoglobuliner har typisk lange sirkulerende halveringstider in vivo.

35 For eksempel, kan IgG-molekyler ha en halveringstid i mennesker på opp til 23 dager. Fc-andelen av immunoglobulinet er ansvarlig, delvis, for denne in vivo stabiliteten. GLP-1-Fc fusjonsproteiner har fordel av stabiliteten tilveiebrakt av

Fc-andelen av et immunoglobulin under bevaring av den biologiske aktiviteten av GLP-1 molekylet.

Selv om denne tilnærmelsen er gjennomførbar for GLP-1 terapi (se WO 02/46227), er det en generell bekymring angående antigenisiteten av ulike fusjonsproteiner når de blir administrert gjentatte ganger over langvarige tidsperioder. Dette er spesielt en bekymring for GLP-1-Fc fusjonsterapi ettersom en pasient med diabetes må bli behandlet hele hennes liv når hun først er diagnostisert med sykdommen. I tillegg, kan Fc fusjonsproteinterapi være en bekymring hvis Fc-andelen beholder uønskede effektorfunksjoner. Denne tilnærmelsen er fokuset i PCT/US04/15595 (WO2005/000892), i hvilken problemer assosiert med den potensielle immunogenisitet og effektor aktivitet assosiert med administrasjon av GLP-1-Fc fusjonsproteiner blir overvunnet ved identifisering av spesifikke GLP-1-Fc fusjonsproteiner som har en redusert risiko for induisering av en immunrespons etter gjentatt og langvarig administrasjon og ikke lenger har effektorfunksjon.

Fusjonsproteinene av denne typen er teknisk for store og komplekse å fremstille syntetisk eller rekombinant i bakterieceller. Disse fusjonsproteinene blir typisk produsert i pattedyrceller, så som CHO, 293 eller NS0. Det ble observert at fusjonsproteinene produsert i pattedyrceller lettere ble utsatt for nedbrytning ved endogene proteaser og kjemisk endring enn ikke-fusjonsproteiner produsert i bakterieceller. Dette problemet ble søkt overvunnet i PCT/US 2005/045376 (WO2006/068910) hvori det ble funnet at en formulering omfattende et GLP-1-Fc fusjonsprotein bufret mellom omkring pH 6 og omkring pH 8,5 tilveiebrakte øket kjemisk stabilitet.

Likevel, selv når ustabilitetene forårsaket av vertscelleproteaser blir holdt i sjakk, trenger ikke formuleringen å være egnet hvis den er fysisk ustabil. Et annet problem observert ved foreliggende oppfinner er dannelsen av løselige aggregater og uløselige partikler etter langtidslagring av en løsningsformulering. Dette problemet blir søkt overvunnet ved en spesifikk kombinasjon av hjelpestoffer og en spesifikk konsentrasjon av et GLP-1-Fc fusjonsprotein.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

For å overvinne problemet med løselige aggregater og uløselige partikler etter langtidslagring av en løsningsformulering av et GLP-1-Fc fusjonsprotein, har foreliggende oppfinner utviklet en fysisk og kjemisk stabil løsningsformulering omfattende omkring 0,5 til omkring 10 mg/ml av et GLP-1-Fc fusjonsprotein, 5 til 20 mM citratbuffer, 0,01 til 0,05 % (w/v) polysorbat-80, og 4,0 til 5,3 % (w/v) mannitol, og som har en pH på 6-7. Denne formuleringen tilveiebrakte uventet og betydelig mindre løselige aggregater og uløselige partikler etter langtidslagring. I tillegg, fant foreliggende oppfinner at denne løsningsformuleringen er mer stabil i en sprøyte enn i et rør etter langvarig "hyllelagring".

Foreliggende oppfinnelse inkluderer også fremgangsmåter for å behandle pasienter som lider av diabetes og overvekt så vel som et mangfold av andre tilstander eller forstyrrelser omfattende administrering av formuleringen av GLP-1-Fc fusjonsproteinet.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

GLP-1-Fc fusjonsproteinet ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en GLP-1 forbindelse fusjonert ved dens C-terminale ende via en peptidforbindelsesgruppe til den N-terminale ende på en analog av en Fc-andel av et immunoglobulin. Fusjonsproteinet er biologisk aktivt som en monomer eller som en homodimer og har en øket halveringstid sammenlignet med naturlig forekommende GLP-1. Det foretrukne GLP-1-Fc fusjonsprotein omfatter aminosyresekvensen gitt ved (SEQ ID NO:1). Det mer foretrukne GLP-1-Fc fusjonsprotein består i hovedsak av aminosyresekvensen gitt ved (SEQ ID NO:1). Det mest foretrukne GLP-1-Fc fusjonsprotein består av aminosyresekvensen gitt ved (SEQ ID NO:1).

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-Cys₅₆-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)

Disulfidbindinger kan eksistere intra-kjede (på hvilken som helst kjede - A eller B) og/eller inter-kjede (mellom begge kjeder - A og B). Eksempler på intra-kjede
 5 disulfidbindinger er: Cys90A - Cys150A, Cys196A - Cys254A, Cys90B - Cys150B, Cys196B - Cys254B. Eksempler på inter-kjede disulfidbindinger er: Cys55A - Cys55B, Cys58A - Cys58B.

10 Biologisk aktivitet refererer til evnen fusjonsproteinet har til å binde til og aktivere GLP-1 reseptoren in vivo og fremkalle en respons. Responser inkluderer, men er ikke begrenset til, sekresjon av insulin, suppresjon av glukagon, inhibering av appetitt, vekttap, induksjon av metthet, inhibering av apoptose, induksjon av pankreatisk betacelleproliferasjon og differensiering av pankreatiske betaceller.

15 GLP-1-Fc fusjonsproteinformuleringen omfatter omkring 0,25 til omkring 10 mg/ml av et GLP-1-Fc fusjonsprotein. Den foretrukne konsentrasjon av fusjonsproteinet, i mg/ml, er i området omkring 0,5 til 10, 0,5 til 5, 0,5 til 2,5, 0,5 til 2, 0,5 til 1,67, 0,5 til 1,5, 0,5 til 1,25, 0,5 til 1, 0,5 til 0,9, 0,5 til 0,8, 0,5 til 0,75, 0,6 til 2, 0,7 til 2, 0,8 til 2, 0,9 til 2, 0,5 til 3, 0,6 til 3, 0,7 til 3, 0,8 til 3, 0,9 til

3, 0,5 til 4, 0,6 til 4, 0,7 til 4, 0,8 til 4, 0,9 til 4, 1 til 2, 1,1 til 2, 1,2 til 2, 1,3 til 2, 1,4 til 2, 1,5 til 2, 1,6 til 2, 0,7 til 1,67, 0,9 til 1,1, 1 til 4, 1,0 til 4,0, 0,5 til 5, 0,25 til 7, 0,25 til 5, 0,25 til 4, 0,25 til 3, 0,25 til 2, 0,25 til 1,5, 0,25 til 1, 0,25 til 0,5. Den foretrukne konsentrasjon av GLP-1-Fc fusjonsproteinet, i mg/ml, er omkring 0,25, omkring 0,42, omkring 0,5, omkring 0,6, omkring 0,67, omkring 0,7, omkring 0,75, omkring 0,8, omkring 0,83, omkring 0,9, omkring 1, omkring 1,1, omkring 1,2, omkring 1,25, omkring 1,3, omkring 1,4, omkring 1,5, omkring 1,6, omkring 1,67, omkring 1,7, omkring 1,8, omkring 1,9, omkring 2, omkring 2,5, omkring 3, omkring 3,33, omkring 4, omkring 5, omkring 6,67 eller omkring 10.

GLP-1-Fc fusjonsproteinformuleringen blir bufret i området omkring 5 til 20 mM citrat. Den foretrukne citratkonsentrasjonen, i mM, er i området omkring 5 til 15, 5 til 12,5, 5 til 10, 7,5 til 20, 7,5 til 15, 7,5 til 12,5, 7,5 til 10, 8 til 20, 8 til 15, 8 til 12,5, 8 til 11, 8 til 10, 9 til 20, 9 til 15, 9 til 12,5, 10 til 20, 10 til 17,5, 10 til 15, 10 til 12,5, 6 til 14, 7 til 13, 8 til 12, 9 til 11, 12 til 20, 14 til 20, 16 til 20 og 18 til 20. Den spesielt foretrukne citratkonsentrasjonen er i området omkring 9 til omkring 11 og omkring 8 til omkring 12 mM. Den spesielt foretrukne citratkonsentrasjonen er omkring 10 eller omkring 10,0.

pH-verdien blir regulert i området på omkring 6 til 7 for å tilveiebringe akseptabel stabilitet, for å opprettholde løseligheten og den insulinotropiske aktiviteten av GLP-1-Fc fusjonsproteinet og være akseptabel for parenteral administrasjon. pH-verdien kan bli regulert ved tilsetning av syre, så som HCl, eller base så som NaOH, til den ønskede pH eller en kombinasjon av citratbuffer og sitronsyre kan bli tilsatt for å oppnå både den ønskede bufferkonsentrasjonen og den ønskede pH. Den foretrukne pH-verdien er i området omkring 6,3 til 6,7, 6,25 til 6,75, 6,2 til 6,8, 6,15 til 6,85, 6,1 til 6,9. Den foretrukne pH-verdien er omkring 6,5.

GLP-1-Fc fusjonsproteinformuleringen omfatter videre mannitol som et isotoniseringsmiddel. Mannitolkonsentrasjonen er i området 4,0 til 5,3 % (w/v). Enheten "(w/v)" betyr masse av bestanddelen per volum av den endelige formuleringen. En formulering som har en mannitolkonsentrasjon på 4,6 % (w/v) har derfor 46 mg mannitol per ml formulering, eller uttrykt på en annen måte, den har 4,6 gram mannitol oppløst i et totalvolum på 100 ml formulering. Den foretrukne mannitolkonsentrasjonen, i % (w/v) er i området omkring 4,0 til omkring 4,1,

omkring 4,1 til omkring 4,2, omkring 4,2 til omkring 4,3, omkring 4,3 til omkring 4,4, omkring 4,4 til omkring 4,5, omkring 4,5 til omkring 4,6, omkring 4,6 til omkring 4,7, omkring 4,55 til omkring 4,75, omkring 4,5 til omkring 4,8, omkring 4,4 til omkring 4,9, omkring 4,3 til omkring 5,0, omkring 4,2 til omkring 5,1, omkring 4,1 til omkring 5,2, omkring 4,7 til omkring 4,8, omkring 4,8 til omkring 4,9, omkring 4,9 til omkring 5,0, omkring 5,0 til omkring 5,1, omkring 5,1 til omkring 5,2, omkring 5,2 til omkring 5,3. Den foretrukne mannitolkonsentrasjonen, i % (w/v) er omkring 4,3, omkring 4,5, omkring 4,55, omkring 4,6, omkring 4,65, omkring 4,64, omkring 4,7, omkring 4,75, omkring 4,8, omkring 4,9, omkring 5,0, omkring 5,1, omkring 5,2 eller omkring 5,3.

GLP-1-Fc fusjonsproteinformuleringen omfatter videre polysorbat-80 som en løseliggjører og/eller stabilisator. Konsentrasjonen av polysorbat-80 er i området omkring 0,01 til 0,05 % (w/v) (eller uttrykt i form av mg/ml, omkring 0,1 til 0,5 mg/ml). Denne konsentrasjonen av polysorbat-80 ble bestemt i kombinasjon med GLP-Fc fusjonsproteinet og mannitol for å minimere dannelsen av løselige aggregater og uløselige partikler. Den foretrukne konsentrasjonen av polysorbat-80, i % (w/v) er i området omkring 0,01 til 0,04, 0,01 til 0,03, 0,015 til 0,025. En foretrukken konsentrasjon av polysorbat-80 er i området omkring 0,018 til omkring 0,022 % (w/v). En annen foretrukken konsentrasjon av polysorbat-80 er i området omkring 0,015 til omkring 0,025 % (w/v). En spesielt foretrukken konsentrasjon av polysorbat-80 er omkring 0,02 % (w/v).

En spesielt foretrukken formulering omfatter GLP-Fc fusjonsproteinet som har aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 1 i en konsentrasjon i området omkring 0,25 til omkring 10 mg/ml, citratbuffer i en konsentrasjon på omkring 10 mM, polysorbat-80 i en konsentrasjon på omkring 0,02 % (w/v), mannitol i en konsentrasjon på omkring 4,6 % (w/v), og en pH på omkring 6,5. En annen spesielt foretrukken formulering omfatter GLP-Fc fusjonsproteinet som har aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 1 i en konsentrasjon i området omkring 0,25 til omkring 5 mg/ml, citratbuffer i en konsentrasjon på omkring 10 mM, polysorbat-80 i en konsentrasjon på omkring 0,02 % (w/v), mannitol i en konsentrasjon på omkring 4,6 % (w/v), og en pH på omkring 6,5. En annen spesiell formulering omfatter GLP-Fc fusjonsproteinet som har aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 1 i en konsentrasjon i området omkring 0,25 til omkring 10 mg/ml, citratbuffer i en konsentrasjon i området omkring 5 til omkring 20 mM, polysorbat-80

i en konsentrasjon på omkring 0,02 % (w/v), mannitol i en konsentrasjon i området omkring 4,5 til omkring 4,8 % (w/v) og en pH i området omkring 6,3 til omkring 6,7. En annen spesiell formulering omfatter GLP-Fc fusjonsproteinet som har aminosyresekvensen ifølge SEQ ID NO: 1 i en konsentrasjon i området omkring 0,25 til omkring 5 mg/ml, citratbuffer i en konsentrasjon i området omkring 5 til omkring 20 mM, polysorbat-80 i en konsentrasjon på omkring 0,02 % (w/v), mannitol i en konsentrasjon i området omkring 4,5 til omkring 4,8 % (w/v), og en pH i området omkring 6,3 til omkring 6,7.

Administrasjon av formuleringene kan skje på enhver måte kjent for å være effektiv av en lege med vanlig kunnskap. Perifer parenteral er én slik fremgangsmåte. Parenteral administrasjon blir i den medisinske litteraturen vanligvis forstått som injeksjonen av en doseringsform til kroppen ved en steril sprøyte eller en annen mekanisk anordning så som en infusjonspumpe. Perifere parenterale måter kan inkludere intravenøse, intramuskulære, subkutane og intraperitoneale måter for administrasjon. Subkutan administrasjon er den foretrukne måte.

Formuleringen ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli brukt for å behandle personer med ikke-insulinavhengig diabetes eller med risiko for å utvikle ikke-insulinavhengig diabetes, insulinavhengig diabetes eller overvekt. En effektiv mengde av GLP-1-Fc fusjonsproteinet i sammenhengen med den beskrevne formuleringen er kvantiteten som resulterer i en ønsket terapeutisk og/eller profylaktisk effekt uten å forårsake uakseptable bivirkninger når administrert til en person med behov for GLP-1 reseptorstimulering.

Det er foretrukket at fusjonsproteinene blir administrert enten én gang hver andre uke eller én gang i uken. Avhengig av sykdommen som blir behandlet, kan det være nødvendig å administrere fusjonsproteinet oftere så som to til tre ganger per uke.

Foreliggende oppfinnelse vil nå bli beskrevet ved bare ikke-begrensede eksempler med referanse til de følgende eksempler.

35

EKSEMPLER

In vitro GLP-1 reseptoraktiveringsanalyse

HEK-293 celler som stabilt uttrykker den humane GLP-1 reseptor, ved anvendelse av et CRE-Luciferase system, blir sådd ved 30 000 celler/brønn/80 µl lavt serum DMEM F 12 medium til 96 brønnplater. Dagen etter såing, blir 20 µl alikvoter av testprotein oppløst i 0,5 % BSA blandet og inkubert med cellene i 5 timer. Generelt blir 12 fortynninger som inneholder fra 3 pM til 3 nM fremstilt ved en 5X konsentrasjon for hvert testprotein før tilsetning til cellene for å generere en doseresponskurve som EC₅₀ verdier blir bestemt fra. Etter inkubering, blir 100 µl Luciferase reagens tilsatt direkte til hver plate og blandet forsiktig i 2 minutter. Plater blir plassert i et Tri-lux luminometer og lysytelse som resulterer fra luciferaseekspressjon blir beregnet.

Analytisk testing av GLP-Fc fusjonsformulering

GLP-Fc fusjonsformuleringsstabilitet blir vurdert ved anvendelse av de følgende fremgangsmåter: ultrafiolett-synlig spektrometri (UV), omvendt fase (RP) kromatografi, "størrelsesutelukkelleskromatografi", anionbyttekromatografi, begrenset kutting med RP kromatografi, absorbans ved 550 nm, dynamisk lysspredning, instron, HIAC og differensiell skanning kalorimetri (mikroDSC). Omvendt-fase (RP) kromatografi blir brukt for å overvåke dannelse av kuttet form GLP-Fc, oksidasjon i Fc regionen og tilsvarende tap av intakt hovedtopp. Størrelsesutelukkelse (SE) HPLC blir brukt for å overvåke polymer- (løselig aggregat) dannelse og tilsvarende tap av monomer. Anionbytte (AEX) HPLC blir brukt for å overvåke ladningsheterogenitet, spesielt dannelse av sure varianter (AV), som vanligvis tilsvarer deamidering og tilsvarende tap av hovedtopp. Begrenset kutting blir brukt for å overvåke nedbrytningsprodukter som er spesifikke for peptid (GLP-1) andelen av GLP-Fc molekylet, så som N-fjerning ved terminal kutting av H1 (His ved posisjon 1 ifølge SEQ ID NO:1) og/eller G2 (Gly ved posisjon 2 ifølge SEQ ID NO:1), proteasekutter ved F22 (Phe ved posisjon 22 ifølge SEQ ID NO:1) og/eller W25 (Trp ved posisjon 25 ifølge SEQ ID NO:1), pyruvylering ved N-terminusen, oksidasjon ved W25 (Trp ved posisjon 25 ifølge SEQ ID NO:1), og fosforylering ved S46 (Ser ved posisjon 46 ifølge SEQ ID NO:1). Absorbans ved 550 nm for å overvåke turbiditet av løsningen på grunn av dannelse av uløselige partikler. Dynamisk lysspredning blir brukt for å måle stort løselig aggregat. Instron blir brukt for å måle filtreringsmotstand, som er en halv-kvantitativ metode opprinnelig utviklet for å måle dannelse av gellignende strukturer i gluka-

gonløsning. Denne teknikken har blitt allment brukt for å vurdere fysisk ustabilitet av GLP-1 peptidløsning. Siden GLP-Fc fusjon er en kombinasjon av en GLP-1 analog med en IgG4 Fc kjede, kan filtreringsmotstandstesting tilveiebringe ytterligere innsikt i naturen av den fysiske ustabiliteten. Testen blir utført for å måle tilbaketrykk fra pressing av løsningen i sprøyte gjennom et 13 mm diameter filter av PVDF membran med 0,2 µm porestørrelse. Trykktilbakevirkningsgrafen har ingen stigning hvis det ikke er noen motstand eller aggregering. Økende stigninger over tid indikerer økende mengder aggregering og/eller gelyring. For å forenkle sammenligning av gjennomkjøringer, blir bare de maksimale motstandsverdier rapportert her. HIAC er en lysblokkeringsteknikk allment brukt i utvikling av parenteral formulering for å overvåke dannelse av uløselige partikulære materier. Differensiell skanning kalorimetri blir brukt for å overvåke utfoldingskarakteristikkene som indikert ved termisk transisjonstemperatur når proteinet begynner å undergå strukturell transisjon.

GLP-Fc fusjonsformuleringer blir fremstilt i henhold til den følgende tabellen:

Formulering GLP-Fc 1 mg/ml	pH	Buffer
1	6	10 mM Citrat
2	6,5	10 mM Citrat
3	7	10 mM Citrat
4	6	10 mM Histidin
5	6,5	10 mM Histidin
6	7	10 mM Fosfat
7	7,5	10 mM Fosfat
8	7,5	10 mM Trometamin
9	8	10 mM Trometamin

GLP-Fc fusjonsformuleringene blir sterilt filtrert gjennom en 0,22 µm polyvinylidenfluorid (PVDF) membran. Løsningene blir lagret i 5 ml glassrører ved 5, 15, 25, 37 og 45 °C inntil de blir analysert eller opp til 20 uker.

Effekter av pH på GLP-Fc stabilitet:

Den følgende tabellen viser hastighetskonstantene for dannelsen av kuttete former av GLP-Fc fusjonsprotein ved 37 °C som bestemt ved RP kromatografi.

Formulering #	Første ordens hastighetskonstant ved 37 °C (uke ⁻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

Den følgende tabellen viser hastighetskonstantene for sur variantdannelse av sure varianter av GLP-Fc fusjonsprotein ved 37 °C som bestemt ved AEX HPLC.

Formulering #	Første ordens hastighetskonstant ved 37 °C (uke ⁻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

Den følgende tabellen viser dannelsen av løselige aggregater (polymer %) av GLP-Fc fusjonsprotein etter 20 ukers lagring ved 37 °C som bestemt ved SE HPLC.

Formulering #	Polymer % etter 20 uker ved 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

Den følgende tabellen viser hastighetskonstantene for N-terminal kutting (des H1/H1G2) ved 37 °C ved begrenset kutting.

Formulering #	Nullte ordens hastighetskonstant ved 37 °C (% uke ⁻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

5

Løselighet og viskositet

Den følgende tabellen viser virkningen av pH på løseligheten og viskositeten av GLP-Fc fusjonsformulering. Løsningen blir først fremstilt i den passende buffer, pH-verdien blir regulert og deretter blir løsningen konsentrert ved sentrifugering ved anvendelse av en Centricon konsentrator. Løsningen blir kontrollert visuelt etter tegn for å ha nådd løsningens løselighetsgrense. Konsentrasjon blir bestemt ved UV absorbans. Viskositet blir målt i Poise (P) hvor $1 \text{ P} = 1 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Vann ved 20 °C har en viskositet på omtrent $0,01 \text{ g cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ som er det samme som 1 centi-Poise (cP).

15

Buffer	pH	Løselighet (mg/ml)	Viskositet (cP)
10 mM citrat	5,5	27,1	Ikke målt
10 mM citrat	5,8	146,2	Ikke målt
10 mM citrat	6,0	179,4	8,3
10 mM citrat	6,5	156,9	5,9
10 mM citrat	7,0	158,1	7,7

Sammenligning av løsningsformuleringsstabilitet

En design av forsøk (DoE) studie blir satt opp for å belyse forholdet mellom nøkkelformuleringsparametere og kjemiske/fysiske stabilitetsegenskaper for molekylet. Basert på dataene, blir det utviklet en kvantitativ modell for å (i) definere en optimal målformulering med hensyn til kjemiske og fysiske stabilitetsegenskaper; (ii) undersøke formuleringsdesignrom for å definere parameterområde for produkt med akseptabel ytelse og (iii) etablere den tilfredsstillende robusthet for formuleringsytelsen innen designrommet utforsket i studien.

Alle formuleringene testet i DoE studien er oppsummert i den følgende tabellen. De ulike formuleringene blir fremstilt og steriltfiltrert gjennom en 0,22 µm polyvinylidenfluorid (PVDF) membran. Formuleringene blir lagret i 3 ml glassrør er ved 5, 25 og 40 °C inntil de blir analysert eller opp til 3 måneder.

	Buffer	pH	GLP-Fc (mg/ml)	Polysorbat 80 (mg/ml)	Tonisitetsmiddel Mannitol (50 g/ml) NaCl (150 mM)	EDTA (%)
1	10 mM Citrat	6,5	10	0,05	Mannitol	0
2	10 mM Citrat	7,0	10	0,35	NaCl	0
3	10 mM Citrat	7,0	10	0,05	Mannitol	0
4	10 mM Citrat	7,0	10	0,35	Mannitol	0
5	10 mM Citrat	7,0	10	0,05	NaCl	0
6	10 mM Citrat	6,5	10	0,35	Mannitol	0
7	10 mM Citrat	6,0	10	0,35	NaCl	0
8	10 mM Citrat	6,0	10	0,05	NaCl	0
9	10 mM Citrat	6,0	10	0,35	Mannitol	0
10	10 mM Citrat	6,5	10	0,2	Mannitol	0
11	10 mM Citrat	7,0	10	0,2	Mannitol	0
12	10 mM Citrat	6,0	10	0,2	Mannitol	0
13	10 mM Citrat	6,5	10	0,2	NaCl	0

14	10 mM Citrat	6,0	10	0,05	Mannitol	0
15	10 mM Citrat	6,5	10	0,2	Mannitol	0
16	10 mM Citrat	6,5	10	0,2	NaCl	0
17	10 mM Citrat	6,5	10	0,2	Mannitol	0,01
18	10 mM Citrat	6,5	10	0,2	NaCl	0,01
19	10 mM Histidin	6,5	10	0,2	Mannitol	0,01
20	10 mM Histidin	6,5	10	0,2	NaCl	0,01

Stabiliteten av formuleringer blir vurdert ved overvåkning av reduksjon av hovedtopp % ved omvendt fase (RP) kromatografi. Hastighetskonstantene for alle formuleringene er vist i den følgende tabellen.

5

Formulering #	Nullte ordens hastighetskonstant ved 40 °C (% måned ⁻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

Det er to typer kuttformer som kan bli overvåket ved RP kromatografi. Den første er de kuttete former ved F22 og/eller W25 av GLP-regionen ved resterende

proteaser. Den andre typen blir kuttet ved forbindelsesgrupperegionen via kjemisk mekanisme. Hastighetskonstantene for alle formuleringer er vist i den følgende tabellen som bestemt ved RP kromatografi.

Formulering #	Nullte ordens hastighetskonstant ved 40 °C (% måned ⁻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

5

Løselig aggregatdannelse blir overvåket ved størrelsesutelukkelse HPLC. Hastighetskonstantene for monomerreduksjon ved 40 °C er vist i den følgende tabellen.

Formulering #	Nullte ordens hastighetskonstant ved 40 °C (% måned ⁻¹)
1	1,08
2	2,18
3	1,19
4	1,21
5	1,63

15

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

N-terminal kutting ved begrenset kutting innen GLP regionen blir overvåket ved begrenset kuttingsanalyse. Hastighetskonstantene for Des H1/H1G2 er vist i den følgende tabellen.

Formulering #	Nullte ordens hastighetskonstant ved 40 °C (% måned ⁻¹)
1	2,39
2	2,77
3	2,45
4	2,47
5	2,35
6	2,72
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

Løselig aggregeringsdannelse etter bevegelse ved orbitalristing ved 400 RPM i 24 timer ble overvåket ved SE HPLC. Monomer-% resultatene er vist i den følgende tabellen.

Formulering #	Monomer %
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
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

5

En hovedbekymring for bevegelsesstabilitet er dannelsen av uløselige partikulære materier, som kan bli overvåket ved HIAC målinger. HIAC resultatene etter bevegelse ved orbitalristing ved 400 RPM i 24 timer er vist i den følgende tabellen.

10

Formulering #	HIAC 10 µm partikkeltellinger
1	400
2	10
3	361
4	5
5	918
6	7
7	205
8	1251
9	17
10	4
11	10

17

12	26
13	29
14	1218
15	24
16	2
17	14
18	16
19	9
20	2

Sammenligning av NaCl vs. mannitolformulering i sprøyte og rør

Formulering	Sammensetning
1	1 mg/ml GLP-Fc, 10 mM Citrat pH 6,5, 150 mM NaCl, 0,02 % (w/v) Polysorbat 80
2	1 mg/ml GLP-Fc, 10 mM Citrat pH 6,5, 5 % (w/v) mannitol, 0,02 % (w/v) Polysorbat 80

Stabilitetssammenligning ved 5 °C av de to formuleringene over ved å sammenligne mannitol og NaCl og sprøyte- og rørlagring.

5

5C	Hovedtopp %			
Tid (mnd)	Formulering 1 sprøyte	Formulering 2 sprøyte	Formulering 1 rør	Formulering 2 rør
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	Kuttet %			
Tid (mnd)	Formulering 1 sprøyte	Formulering 2 sprøyte	Formulering 1 rør	Formulering 2 rør
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	Monomer %			
Tid (mnd)	Formulering 1 sprøyte	Formulering 2 sprøyte	Formulering 1 rør	Formulering 2 rør
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 = Ikke bestemt

Stabilitetssammenligning ved 25 °C av de to formuleringene over ved å sammenligne mannitol og NaCl og sprøyte- og rørlagring

25C	Hovedtopp %			
Tid (mnd)	Formulering 1 sprøyte	Formulering 2 sprøyte	Formulering 1 rør	Formulering 2 rør
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	Kuttet %			
Tid (mnd)	Formulering 1 sprøyte	Formulering 2 sprøyte	Formulering 1 rør	Formulering 2 rør
0	0,3	0,2	0,3	0,2
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	Monomer %			
Tid (mnd)	Formulering 1 sprøyte	Formulering 2 sprøyte	Formulering 1 rør	Formulering 2 rør
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

5

ND = Ikke bestemt

Stabilitetssammenligning ved 40 °C av de to formuleringene over ved å sammenligne mannitol og NaCl og sprøyte- og rørlagring

40C	Hovedtopp %			
Tid (mnd)	Formulering 1 sprøyte	Formulering 2 sprøyte	Formulering 1 rør	Formulering 2 rør
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	Kuttet %			
Tid (mnd)	Formulering 1 sprøyte	Formulering 2 sprøyte	Formulering 1 rør	Formulering 2 rør
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	Monomer %			
Tid (mnd)	Formulering 1 sprøyte	Formulering 2 sprøyte	Formulering 1 rør	Formulering 2 rør
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 = Ikke bestemt

Mannitolkonsentrasjonsbestemmelse

- 5 Mannitolkonsentrasjonen nødvendig for å oppnå måltonisiteten på 290 milli-Osmolaritet/kg for en GLP-Fc fusjonsproteinløsningsformulering blir bestemt ved titreringsforsøk. Den følgende tabellen oppsummerer den resulterte osmolalitet som en funksjon av mannitolkonsentrasjon. Basert på lineær regresjonsanalyse av osmolalitetsresultater til mannitolkonsentrasjon med en statistisk p-verdi på < 0,01, blir mannitolkonsentrasjonen bestemt til å være
- 10 46,4 mg/ml eller 4,64 %.

Volum (ml) 10 mM citratbuffer	Volum (ml) 10 mM citrat/buffer med 50 mg/ml mannitol	Endelig mannitolkonsen- trasjon (mg/ml)	Osmolalitet (mOsm/kg)		
			Rep1	Rep2	Gj.sn.
1,0	0	0	34	34	34
0,2	9,8	49,0	308	302	305
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

20

1,0	9,0	45,0	280	281	281
-----	-----	------	-----	-----	-----

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> GLP-1-Fc FUSION PROTEIN FORMULATION

<130> X17652

<140> PCTUS0869473

<141> 2008-07-09

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 275

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Glu
 35 40 45

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 50 55 60

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 65 70 75 80

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 85 90 95

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 100 105 110

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 115 120 125

22

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 130 135 140

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 145 150 155 160

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 165 170 175

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 180 185 190

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 195 200 205

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 210 215 220

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 225 230 235 240

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 245 250 255

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 260 265 270

Ser Leu Gly
 275

Patentkrav

1.

5 Stabil løsningsformulering omfattende en terapeutisk effektiv mengde av et GLP-1-Fc fusjonsprotein i citratbuffer med polysorbat-80 i området 0,01 % til 0,05 % (w/v), mannitol i området 4,3 til 5,0 % (w/v), og hvori løsningen har en pH i området pH 6 til 7.

2.

10 Stabil løsningsformulering ifølge krav 1, hvori den terapeutisk effektive mengde av et GLP-1-Fc fusjonsprotein er i området 0,25 til 10 mg/ml.

3.

15 Stabil løsningsformulering ifølge krav 2, hvori den terapeutisk effektive mengde av et GLP-1-Fc fusjonsprotein er i området 0,25 til 5 mg/ml.

4.

20 Stabil løsningsformulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3, hvori konsentrasjonen av citratbuffer er i området 5 til 20 mM.

5.

25 Stabil løsningsformulering ifølge krav 4, hvori konsentrasjonen av citratbuffer er omkring 10 mM.

6.

30 Stabil løsningsformulering ifølge ethvert av krav 1 til 5, hvori konsentrasjonen av polysorbat-80 er omkring 0,02 % (w/v).

7.

35 Stabil løsningsformulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 6, hvori konsentrasjonen av mannitol er i området 4,5 til 4,8 % (w/v).

8.

40 Stabil løsningsformulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7, hvori konsentrasjonen av mannitol er omkring 4,6 % (w/v).

9.

Stabil løsningsformulering ifølge ethvert av krav 1 til 8, hvori aminosyresekvensen av GLP-1-Fc fusjonsproteinet er den gitt ved SEQ ID NO: 1

5

10.

Stabil løsningsformulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 9, hvori konsentrasjonen av GLP-1-Fc fusjonsproteinet er i området omkring 0,25 til 5 mg/ml, konsentrasjonen av citrat er omkring 10 mM, konsentrasjonen av polysorbat-80 er omkring 0,02 % (w/v), konsentrasjonen av mannitol er omkring 4,6 % (w/v) og pH-verdien er i området 6,3 til 6,7.

10

11.

Stabil løsningsformulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 10, hvori konsentrasjonen av GLP-1-Fc fusjonsprotein er omkring 1 mg/ml.

15

12.

Stabil løsningsformulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvori pH-verdien er omkring 6,5.

20

13.

Stabil løsningsformulering ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12, hvori formuleringen blir lagret i en steril sprøyte.

14.

25

Stabil løsningsformulering ifølge et hvilket som helst av de foregående krav for anvendelse i behandlingen av ikke-insulinavhengig diabetes.

15.

30

Stabil løsningsformulering ifølge et hvilket som helst av krav 1 til 13 for anvendelse i behandlingen av overvekt.