

COMPOSICIONES DE GLP-1 Y SUS USOS

La presente invención se refiere al campo de las composiciones farmacéuticas que comprenden péptido GLP-1 semaglutida.

5 ANTECEDENTES

Se sabe que los péptidos GLP-1 son propensos a desarrollar falta de estabilidad en soluciones líquidas, por ejemplo, falta de estabilidad física. Por lo tanto, se desean composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden péptidos GLP-1 con una estabilidad aún mejor. Tal estabilidad mejorada puede ser estabilidad física y/o estabilidad
10 química.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En algunas modalidades, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden semaglutida y no más de 0.01 % (p/p) de fenol. En algunas
15 modalidades, la invención se refiere a kits que comprenden la composición farmacéutica como se define en la presente descripción. En algunas modalidades, la invención se refiere a la composición farmacéutica como se define en la presente descripción para usar en medicina.

20 DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden péptido GLP-1 semaglutida y no más de 0.01 % (p/p) de fenol. Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que tales composiciones tienen una estabilidad química y/o física mejorada. En algunas modalidades, la composición no comprende fenol. En
25 algunas modalidades, la composición comprende 0.01-10 mg/ml de semaglutida. En algunas modalidades, la composición tiene un pH en el intervalo de 6.0-10.0, tal como 7.0-7.8.

En algunas modalidades, la composición de la invención es una composición farmacéutica líquida que comprende semaglutida y no más de 0.01 % (p/p) de fenol, en
30 donde dicha composición

- a. es para la administración parenteral;
- b. es una solución acuosa que comprende al menos 60 % p/p de agua; o

c. comprende además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un tampón o un agente isotónico.

En algunas modalidades, la composición de la invención es una composición farmacéutica líquida que comprende semaglutida, no más de 0.01 % (p/p) de fenol, y
5 opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, en donde la formulación es para la administración parenteral, tal como la administración subcutánea.

En algunas modalidades, la composición de la invención es una composición farmacéutica líquida que comprende semaglutida, no más de 0.01 % (p/p) de fenol, al
10 menos 60 % p/p de agua, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En algunas modalidades, el término "**estabilidad**" como se usa en la presente descripción se refiere a la estabilidad de semaglutida en una composición farmacéutica líquida. En algunas modalidades, la estabilidad es la estabilidad química del péptido GLP-
1 (por ejemplo, determinada por HPLC, tal como el Ensayo (I) en la presente descripción),
15 y opcionalmente la estabilidad física del péptido GLP-1 (por ejemplo, determinada por el ensayo de Tioflavina T, tal como el Ensayo (II) en la presente descripción).

En algunas modalidades, el término "**estabilidad química**" en relación con la semaglutida, como se usa en la presente descripción, se refiere a que los enlaces covalentes del compuesto de semaglutida están sustancialmente intactos. En algunas
20 modalidades, la estabilidad química de un péptido GLP-1 se determina por HPLC, tal como el Ensayo (I) en la presente descripción. En algunas modalidades, una composición posee estabilidad química si sus enlaces covalentes están intactos en al menos 80 % (p/v) de dichos péptidos GLP-1 después del almacenamiento durante 3 meses a 25 °C. En algunas modalidades, la estabilidad química de la semaglutida se determina mediante
25 el ensayo (IV) en la presente descripción.

En algunas modalidades, el término "**estabilidad física**" en relación con la semaglutida, como se usa en la presente descripción, se refiere a la semaglutida que no forma sustancialmente agregados, por ejemplo, en la forma de formación de fibrillas. En algunas
30 modalidades, la estabilidad física se determina mediante el ensayo de tioflavina T, tal como el Ensayo (II) en la presente descripción.

En algunas modalidades, la composición de la presente invención es una composición farmacéutica estable. El término "composición farmacéutica estable" cuando se usa en la

presente descripción se refiere a una composición farmacéutica, por ejemplo, una solución o suspensión, que comprende el péptido GLP-1, y cuya composición después del almacenamiento comprende al menos 80 % (p/v) de dicho péptido GLP-1 (por ejemplo, después de un almacenamiento inactivo durante 3 meses a 25 °C). Las condiciones de almacenamiento para las pruebas de estabilidad pueden ser 2-8 °C, tal como 5 °C, o al menos 2.5 años a 5 °C. Alternativamente, las condiciones de almacenamiento para las pruebas de estabilidad pueden ser de al menos 4 semanas, tal como 6 semanas o 3 meses, opcionalmente a 30 °C. Las condiciones de almacenamiento para esta composición farmacéutica estable pueden ser a 5 °C durante 1 o 2 años. Las condiciones de almacenamiento para esta composición farmacéutica estable pueden ser a 5 °C durante 3 años. Alternativamente, las condiciones de este almacenamiento pueden ser a 25 °C durante 24 horas o 1 semana. En otra alternativa más, las condiciones de este almacenamiento pueden ser a temperatura ambiente durante dos meses, tal como hasta dos meses.

En algunas modalidades, la estabilidad química del péptido GLP-1 requiere al menos 80 % (p/v), tal como al menos 90 % (p/v) o al menos 95 % (p/v), de dicho péptido GLP-1 restante con sus enlaces covalentes intactos al final del período de almacenamiento. En algunas modalidades, la estabilidad química del péptido GLP-1 requiere al menos 95 % (p/v), tal como al menos 97 % (p/v) o al menos 99 % (p/v), de dicho péptido GLP-1 restante con sus enlaces covalentes intactos al final del período de almacenamiento.

La composición de la invención comprende no más de 0.01 % (p/p) de fenol. En algunas modalidades, la composición no comprende sustancialmente fenol.

Composiciones farmacéuticas

Los términos “composición farmacéutica” y “composición” se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto que lo necesita.

En algunas modalidades la composición comprende 0.01-100 mg/ml de semaglutida. En algunas modalidades la composición comprende 0.1-50 mg/ml, o tal como 0.5-25 mg/ml o 1-15 mg/ml, de semaglutida. En algunas modalidades la composición comprende 0.1-10 mg/ml, o tal como 0.5-5 mg/ml o 1-2 mg/ml, de semaglutida. En algunas modalidades la composición comprende 0.01-10 mg/ml, o tal como 0.01-5 mg/ml, de semaglutida. En algunas modalidades, la composición comprende no más de 9 mg/ml, tal como no más de

8 mg/ml o no más de 7 mg/ml, de semaglutida. En algunas modalidades, la composición comprende no más de 6 mg/ml, tal como no más de 5 mg/ml o no más de 4 mg/ml, de semaglutida. En algunas modalidades, la composición comprende no más de 3 mg/ml, tal como no más de 2 mg/ml o no más de 1 mg/ml, de semaglutida. En algunas modalidades, la composición comprende al menos 0.01 mg/ml, tal como al menos 0.02 mg/ml o al menos 0.05 mg/ml, de semaglutida. En algunas modalidades la composición comprende 1.34 mg/ml de semaglutida.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la invención tiene un pH en el intervalo de 3-10. tal como pH 6-10 o 6-9. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la invención tiene un pH en el intervalo de pH 6.5-8.5, tal como pH 7.0-7.8.

En algunas modalidades, la composición de la invención comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En algunas modalidades, la composición de la invención comprende un agente isotónico, tal como propilenglicol. En algunas modalidades, el agente isotónico es propilenglicol o cloruro de sodio.

En algunas modalidades, la composición de la invención comprende un tampón, tal como tampón fosfato, TRIS, citrato o no contiene tampón. En algunas modalidades el tampón fosfato es un tampón fosfato de sodio, tal como un tampón de hidrógeno fosfato de sodio.

En algunas modalidades, la composición de la invención no comprende conservante.

La composición de la invención tiene forma de una composición farmacéutica líquida. En algunas modalidades, la composición farmacéutica líquida es una solución o una suspensión. En algunas modalidades, la composición de la invención tiene forma de una solución, tal como una solución acuosa. En algunas modalidades, el término "solución acuosa" como se usa en la presente descripción se refiere a una solución que comprende al menos 60 % p/p de agua. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende 60-99 % p/p de agua. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende al menos 75 % p/p de agua, tal como al menos 80 % p/p de agua o al menos 85 % p/p de agua. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende al menos 90 % p/p de agua, tal como al menos 92 % p/p de agua o al menos 94 % p/p de agua.

Semaglutida

El péptido GLP-1 semaglutida puede prepararse como se describe en el documento WO2006/097537, Ejemplo 4. La semaglutida se conoce también como N^{6,26}-{18-[N-(17-carboxiheptadecanoil)-L-γ-glutamyl]-10-oxo-3,6,12,15-tetraoxa-9,18-diazaodecanoil]-[8-(ácido 2-amino-2-propanoico),34-L-arginina]péptido similar al glucagón 1(7-37) humano, ver WHO Drug Information Vol. 24, Núm. 1, 2010. En algunas modalidades, la semaglutida puede estar presente en la composición en su forma total o parcialmente ionizada; por ejemplo, uno o más grupos de ácido carboxílico (-COOH) se pueden desprotonar en el grupo carboxilato (-COO⁻) y/o uno o más grupos amino (-NH₂) puede ser protonado en el grupo -NH₃⁺. En algunas modalidades la semaglutida se añade a la composición en la forma de una sal.

Administración y kits

La composición de la invención es para la administración parenteral. En algunas modalidades, la composición es para la administración subcutánea.

En algunas modalidades, la composición de la invención es para la administración una vez por semana. En algunas modalidades, la composición de la invención es para la administración una vez al día, una vez cada segundo o una vez cada tercer día.

En algunas modalidades, la invención se refiere a un kit que comprende la composición farmacéutica como se define en la presente descripción e instrucciones de uso. En algunas modalidades, las instrucciones de uso comprenden el prospecto de un fármaco.

En algunas modalidades, la invención se refiere a un kit que comprende la composición farmacéutica como se define en la presente descripción y un dispositivo de inyección. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección se selecciona del grupo que consiste en una pluma duradera y una pluma precargada. Los ejemplos de plumas duraderas son NovoPen® 4 o NovoPen® 5 (ambos de Novo Nordisk A/S, Dinamarca). Un ejemplo de una pluma precargada es FlexPen® (Novo Nordisk A/S, Dinamarca).

Indicaciones

En algunas modalidades, las composiciones de la invención son para usar en medicina. En algunas modalidades, la composición de la invención puede usarse para los siguientes tratamientos médicos:

(i) prevención y/o tratamiento de todas las formas de diabetes, tales como hiperglicemia, diabetes tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes tipo 1, diabetes no dependiente

de insulina, MODY (diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes), diabetes gestacional, y/o para la disminución de la HbA1c;

(ii) retardar o evitar la progresión de la enfermedad diabética, tal como la progresión en la diabetes tipo 2, retardar la progresión de la tolerancia alterada a la glucosa (IGT) a diabetes tipo 2 que requiere insulina, y/o retardar la progresión de la diabetes tipo 2 que no requiere insulina a diabetes tipo 2 que requiere insulina;

(iii) prevención y/o tratamiento de trastornos alimentarios, tales como obesidad, por ejemplo, mediante la disminución de la ingesta de alimentos, disminución del peso corporal, supresión del apetito, inducción de la saciedad; tratamiento o prevención del trastorno por atracón, la bulimia nerviosa y/o la obesidad inducida por la administración de un antipsicótico o un esteroide; disminución de la motilidad gástrica; y/o retrasar el vaciamiento gástrico.

En algunas modalidades la indicación es (i). En algunas modalidades la indicación es (ii). Aún en un aspecto particular adicional la indicación es (iii). En algunas modalidades la indicación es diabetes tipo 2 y/u obesidad.

En algunas modalidades el método o el uso comprenden la prevención, el tratamiento, la disminución y/o la inducción en una o más enfermedades o afecciones definidas en la presente descripción. En algunas modalidades la indicación es (i) y (iii). En algunas modalidades la indicación es (ii) y (iii). En algunas modalidades la invención comprende la administración de una cantidad con eficacia de un péptido GLP-1. En algunas modalidades la invención se refiere a la administración de una cantidad con eficacia de un péptido GLP-1.

Generalmente, todos los sujetos que padecen de obesidad se considera, además, que sufren de sobrepeso. En algunas modalidades la invención se refiere a un método para el tratamiento o prevención de la obesidad. En algunas modalidades la invención se refiere al uso de la composición para el tratamiento o prevención de la obesidad. En algunas modalidades, el sujeto que padece de obesidad es humano, tal como un humano adulto o un humano pediátrico (lo que incluye lactantes, niños y adolescentes). El índice de masa corporal (IMC) es una medida de la grasa del cuerpo basada en la altura y el peso. La fórmula para su cálculo es $IMC = \text{peso en kilogramos} / \text{altura en metros}^2$. Un sujeto humano que padece de obesidad puede tener un IMC de ≥ 30 ; este sujeto puede referirse, además, como obeso. En algunas modalidades, el sujeto humano que padece de

obesidad puede tener un IMC de ≥ 35 o un IMC en el intervalo de ≥ 30 a < 40 . En algunas modalidades la obesidad es obesidad grave u obesidad mórbida, en donde el sujeto humano puede tener un IMC de ≥ 40 .

5 En algunas modalidades la invención se refiere a un método para el tratamiento o la prevención del sobrepeso, opcionalmente en presencia de al menos una comorbilidad relacionada con el peso. En algunas modalidades la invención se refiere al uso de la composición para el tratamiento o la prevención del sobrepeso, opcionalmente en presencia de al menos una comorbilidad relacionada con el peso. En algunas modalidades, el sujeto que padece de sobrepeso es humano, tal como un humano adulto
10 o un humano pediátrico (lo que incluye lactantes, niños y adolescentes). En algunas modalidades, un sujeto humano que padece de sobrepeso puede tener un IMC de ≥ 25 , tal como un IMC de ≥ 27 . En algunas modalidades, un sujeto humano que padece de sobrepeso tiene un IMC en el intervalo de 25 a < 30 o en el intervalo de 27 a < 30 . En algunas modalidades la comorbilidad relacionada con el peso se selecciona del grupo que
15 consiste en hipertensión, diabetes (tal como diabetes tipo 2), dislipidemia, colesterol alto y apnea obstructiva del sueño.

En algunas modalidades la invención se refiere a un método para la reducción del peso corporal. En algunas modalidades la invención se refiere al uso de la composición para la reducción del peso corporal. Un humano sujeto a reducción del peso corporal de acuerdo
20 con la presente invención puede tener un IMC de ≥ 25 , tal como un IMC de ≥ 27 o un IMC de ≥ 30 . En algunas modalidades, el humano que se somete a reducción del peso corporal de acuerdo con la presente invención puede tener un IMC de ≥ 35 o un IMC de ≥ 40 . El término “reducción del peso corporal” puede incluir tratamiento o prevención de la obesidad y/o sobrepeso.

25 En algunas modalidades, como se usa en la presente descripción, los valores específicos dados en relación con números o intervalos pueden entenderse como el valor específico o como aproximadamente el valor específico (por ejemplo, más o menos 10 por ciento del valor específico).

Modalidades de la invención

30 Las siguientes son modalidades no limitantes de la invención:

1. Una composición farmacéutica líquida que comprende semaglutida y no más de 0.01 % (p/p) de fenol.

2. Una composición farmacéutica líquida que comprende semaglutida y sustancialmente sin fenol.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha composición no comprende fenol.
- 5 4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición es una solución acuosa que comprende al menos 60 % p/p de agua, tal como al menos 70 % p/p de agua o al menos 80 % p/p de agua.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la concentración de semaglutida es 0.5-10 mg/ml de dicha composición.
- 10 6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha semaglutida tiene forma de una sal farmacéuticamente aceptable.
7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 15 8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende uno o más agentes para ajustar el pH, tal como HCl, NaOH o acetato.
9. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición comprende un tampón y/o un agente isotónico.
- 20 10. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho tampón está presente en una concentración de 0.01-50 mM de dicha composición.
11. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho tampón es un tampón de fosfato.
- 25 12. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho tampón fosfato se selecciona del grupo que consiste en dihidrógeno fosfato de sodio, hidrógeno fosfato de disodio y fosfato de sodio.
13. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho agente isotónico está presente en una concentración de 8 mg/ml a 50 mg/ml, tal como 14 mg/ml a 30 mg/ml, de dicha composición.
- 30 14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho isotónico es propilenglicol.

15. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición no comprende conservante.
16. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición tiene un pH en el intervalo de 6.0-10.0.
- 5 17. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición es para la administración parenteral.
18. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha composición es para la administración subcutánea.
19. Un kit que comprende la composición farmacéutica como se define en cualquiera de
10 las reivindicaciones anteriores y las instrucciones de uso.
20. Un kit que comprende la composición farmacéutica como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un dispositivo de inyección para la administración de dicha composición a un sujeto, en donde dicho dispositivo de inyección se selecciona del grupo que consiste en una pluma duradera y una pluma precargada.
- 15 21. Una composición farmacéutica como se definió de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar en medicina.
22. La composición farmacéutica para usar como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar en el tratamiento de diabetes u obesidad.
23. Un método para la prevención o el tratamiento de diabetes u obesidad, en donde la
20 composición farmacéutica como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores se administra a un sujeto que la necesita.

Ejemplos

Métodos generales y caracterización

Preparación de composiciones de semaglutida:

5 A menos que se indique lo contrario, las composiciones de semaglutida se prepararon disolviendo el tampón (por ejemplo, dihidrato de hidrógeno fosfato de disodio), agente isotónico (por ejemplo, propilenglicol) y opcionalmente conservante (fenol) en agua. La semaglutida se disolvió en el mismo, el pH se ajustó a 7.4 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico, y la composición se esterilizó finalmente mediante filtración a través de un filtro estéril de 0.22 µm.

10 *Preparación de composiciones de liraglutida:*

A menos que se indique lo contrario, las composiciones de liraglutida se prepararon a partir de la Solución 1 y la Solución 2: La Solución 1 se preparó disolviendo tampón (dihidrato de hidrógeno fosfato de disodio), agente isotónico (manitol) y opcionalmente conservante (fenol) en agua. La Solución 2 se preparó disolviendo liraglutida mientras se
15 agitaba lentamente. La Solución 1 y la Solución 2 se mezclaron, el pH se ajustó a 8.15 mediante el uso de hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico, y la composición finalmente se esterilizó mediante filtración a través de un filtro estéril de 0.22 µm.

Ensayo (I): Determinación del contenido de proteínas de alto peso molecular (HMWP) de las composiciones de semaglutida

20 La determinación del contenido de HMWP se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC) mediante el uso de una columna Waters Insulin HMWP con una fase móvil de cloruro de sodio, fosfato de sodio, ácido fosfórico e isopropanol, elución isocrática y detección a 280 nm. El contenido de HMWP se proporciona en % como el área combinada de picos cromatográficos que eluyen antes que el pico del monómero de
25 semaglutida (es decir, picos de HMWP), con relación al área total de HMWP y los picos del monómero de semaglutida.

Ensayo (II): Estabilidad física de las composiciones de semaglutida evaluadas mediante ThT

El propósito de este ensayo es evaluar la estabilidad física de un péptido GLP-1 en
30 solución acuosa.

La baja estabilidad física de un péptido o proteína puede conducir a la formación de fibrillas amiloides. Las fibrillas son estructuras macromoleculares filamentosas,

estructuralmente bien ordenadas, formadas por la agregación de proteínas solubles y dominadas por la estructura de la lámina beta. Las fibrillas maduras son insolubles y resistentes a la degradación. En aras de la calidad del producto farmacológico y la seguridad del paciente, es conveniente minimizar y controlar los eventos de fibrilación en composiciones farmacéuticas de péptidos y proteínas terapéuticos. La agregación de proteínas, incluida la formación de fibrillas, puede evaluarse mediante inspección visual de una muestra. La formación de fibrillas puede evaluarse mediante el uso de Tioflavina T (ThT), una sonda indicadora de molécula pequeña con una alta especificidad por las fibrillas. ThT tiene características de fluorescencia distintas cuando se une a fibrillas en comparación con ThT en solución [Naiki y otros (1989) *Anal. Biochem.* 177, 244-249; LeVine (1999) *Methods. Enzymol.* 309, 274-284].

La formación de un intermediario parcialmente plegado del péptido se sugiere como un mecanismo de iniciación general para la formación de fibrillas. Una pequeña cantidad de esos intermediarios se nuclea para formar una plantilla sobre la cual los intermediarios posteriores pueden ensamblarse y se procede a la formación de fibrillas. El tiempo de retraso corresponde al intervalo en el que se genera una cantidad crítica de núcleos y la constante de velocidad aparente es la velocidad con la que se forma la propia fibrilla. El tiempo de retraso descrito en un ensayo ThT realizado en un lector de placas, por lo tanto, se considera indicativo de la tendencia a la formación de fibrillas de una composición peptídica en solución.

Antes de realizar el ensayo, se añadió ThT a las muestras de una solución madre en H₂O a una concentración final de 20 µM en muestras. Las alícuotas de muestra de 200 µl de la composición que comprende el péptido GLP-1 se colocaron en una placa de microtitulación de 96 pocillos (óptica 0.4 ml negra Thermo Scientific Nunc) con una perla de vidrio (2.8-3.2 mm, Whitehouse Scientific) colocada en cada pocillo. Por lo general, se colocaron ocho réplicas de cada muestra en la placa. La placa se selló con cinta de sellado (Thermo Scientific Nunc).

La incubación a la temperatura dada, la agitación y la medición de la emisión de fluorescencia de ThT se realizaron en un BMG FLUOStar Omega o un BMG FLUOStar Optima. La placa se incubó a 40 °C con doble agitación orbital a 300 rpm con una amplitud de 2 mm. La medición de la fluorescencia se realizó mediante el uso de excitación a través de un filtro de 450 nm y la medición de la emisión a través de un filtro

de 480 nm. La placa se midió cada 20 minutos durante un período de tiempo deseado. Entre cada medición, la placa se agitó y se calentó como se describió.

El valor umbral se determinó como la fluorescencia de ThT más alta (en unidades de fluorescencia relativa (RFU)) medida en la placa en el tiempo de 1 h 13 min, más 100

5 RFU. El valor umbral se usó para calcular el tiempo de retraso mediante el uso del método de "tiempo hasta el umbral" en el software BMG FLUOstar.

Ensayo (III): Determinación de la pureza de liraglutida

La determinación de la pureza se realizó mediante cromatografía líquida de alta
10 resolución (HPLC) mediante el uso de una columna Waters XTerra™ MS C18 con un gradiente de elución de dos fases móviles, donde una fase móvil era una mezcla acuosa de tampón fosfato de amonio (pH 8)/acetonitrilo y la otra fase móvil fue acetonitrilo en agua. La detección se realizó a 215 nm.

Ensayo (IV): Determinación de la suma de impurezas de semaglutida

15 La determinación de la pureza de semaglutida se realiza mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) mediante el uso de una columna Kinetex C18 con una elución isocrática seguida de una elución en gradiente de dos fases móviles, donde una fase móvil era una mezcla acuosa de tampón fosfato/acetonitrilo y la otra fase móvil era una mezcla acuosa de acetonitrilo/isopropanol. La detección se realizó a 210
20 nm. La pureza de semaglutida se proporciona como la suma de impurezas en % como el área combinada de todos los picos cromatográficos con relación a los picos del monómero de semaglutida.

Ejemplo 1: Semaglutida

Las composiciones que comprenden semaglutida se probaron en este experimento. Las
25 composiciones probadas contenían semaglutida (como se especifica en la Tabla 1), propilenglicol (14 mg/ml), dihidrato de hidrógeno fosfato de disodio (1.42 mg/ml) y opcionalmente fenol (5.5 mg/ml) (como se especifica en la Tabla 1), a pH 7.4 en una solución acuosa. Estas composiciones se prepararon como se describe en la presente descripción en la sección Métodos Generales de Preparación. La estabilidad química
30 expresada mediante HMWP se determinó mediante el Ensayo (I) descrito en la presente descripción al comienzo del experimento y después del almacenamiento a 25 °C, 30 °C o

37 °C. La estabilidad física expresada mediante el ensayo de tioflavina T (ThT) se determinó mediante el Ensayo (II) descrito en la presente descripción.

Los resultados se proporcionan en la Tabla 2 y 3. Sorprendentemente, estos resultados muestran que la estabilidad física y química de la semaglutida se mejoró en las composiciones sin fenol con relación a aquellas con fenol. Los resultados que se muestran en la Tabla 3 son un promedio de 8 muestras probadas.

Tabla 1.Composiciones probadas en el Ejemplo 1

Composición núm.	Descripción
1	Semaglutida 1 mg/ml, con fenol
2	Semaglutida 1 mg/ml, sin fenol
3	Semaglutida 1.34 mg/ml, con fenol
4	Semaglutida 1.34 mg/ml, sin fenol
5	Semaglutida 0.5 mg/ml, sin fenol
6	Semaglutida 0.5 mg/ml, con fenol
7	Semaglutida 1.0 mg/ml, sin fenol
8	Semaglutida 1.0 mg/ml, con fenol
9	Semaglutida 2.0 mg/ml, sin fenol
10	Semaglutida 2.0 mg/ml, con fenol

Tabla 2.Estabilidad química de las composiciones de semaglutida, según se expresa por el contenido de proteínas de alto peso molecular (HMWP), después del almacenamiento a diferentes temperaturas. Una concentración más baja de HMWP corresponde a una mejor estabilidad química.

Composición núm.	HMWP (%)			
	0 meses	25 °C 6 meses	30 °C 3 meses	37 °C 3 meses
1	0.1	2.0	1.9	4.1
2 (sin fenol)	0.1	0.3	0.3	0.5
3	0.1	1.9	1.8	3.9
4 (sin fenol)	0.1	0.3	0.4	0.6

Tabla 3.Estabilidad física de las composiciones de semaglutida expresadas mediante el ensayo de tioflavina T (ThT). Un tiempo de retraso más largo corresponde a una mejor estabilidad física.

Composición núm.	Tiempo de retraso (horas)
5 (sin fenol)	> 117
6	19
7 (sin fenol)	> 117
8	35
9 (sin fenol)	> 117
10	35

5 Ejemplo 2 (Referencia): Liraglutida

Los resultados del Ejemplo 1 también son sorprendentes en vista del hecho de que el compuesto GLP-1 liraglutida, a diferencia de la semaglutida, es menos químicamente estable en una composición sin fenol. Estos resultados se muestran en la Tabla 5.

Los resultados en la Tabla 5 se obtuvieron de la siguiente manera: Se probaron las composiciones que comprenden liraglutida. Las composiciones probadas contenían liraglutida (como se especifica en la Tabla 4), manitol (36.9 mg/ml), hidrógeno fosfato de disodio (1.42 mg/ml) y opcionalmente fenol (como se especifica en la Tabla 4), a pH 7.4 en una solución acuosa. Estas composiciones se prepararon como se describe en la presente descripción en la sección Métodos Generales de Preparación. La estabilidad química expresada por la pureza se determinó mediante el Ensayo (III) descrito en la presente descripción al comienzo del experimento y después del almacenamiento a 25 °C o a 37 °C.

Tabla 4.Composiciones probadas en el Ejemplo 2

Composición núm.	Descripción
11	Liraglutida (3 mg/ml), sin fenol (pH 7.4)
12	Liraglutida (3 mg/ml), fenol (0.04 mg/ml) (pH 7.4)
13	Liraglutida (3 mg/ml), fenol (0.16 mg/ml) (pH 7.4)

14	Liraglutida (3 mg/ml), fenol (0.8 mg/ml) (pH 7.4)
15	Liraglutida (3 mg/ml), fenol (2.5 mg/ml) (pH 7.4)

Tabla 5. Estabilidad química, expresada según la pureza, de las composiciones que comprenden liraglutida después del almacenamiento a diferentes temperaturas. Una mayor pureza corresponde a una mejor estabilidad química.

Composición núm.	Pureza (%)		
	0 meses	3 meses a 25°C	3 meses a 37°C
11 (sin fenol)	98	88	72
12	98	93	80
13	98	94	81
14	97	95	83
15	98	95	84

5

Ejemplo 3: Semaglutida - experimentos adicionales

Las composiciones que comprenden semaglutida se probaron en este experimento. Las composiciones probadas contenían semaglutida, agente isotónico (propilenglicol (14 mg/ml) o cloruro de sodio (6.3 mg/ml)), opcionalmente tampón (dihidrato de hidrógeno fosfato de disodio (1.42 mg/ml) o dihidrato de citrato de trisodio (2.35 mg/ml)), y

10 opcionalmente fenol (5.5 mg/ml o 0.1 mg/ml), a pH 7.0, 7.4 o 7.8 en una solución acuosa; los detalles de cada composición probada se muestran en la Tabla 6. Las composiciones se prepararon como se describe en la presente descripción en la sección Métodos Generales de Preparación. La estabilidad química expresada mediante HMWP se

15 determinó mediante el Ensayo (I) y la expresión de la suma de impurezas se determinó mediante el Ensayo (IV) descrito en la presente descripción al inicio del experimento y después del almacenamiento a 30 °C. La estabilidad física expresada mediante el ensayo de tioflavina T (ThT) se determinó mediante el Ensayo (II) descrito en la presente descripción.

20 Los resultados se proporcionan en la Tabla 7 y 8. En línea con los resultados del Ejemplo 1, estos resultados muestran que la estabilidad física y la estabilidad química de la semaglutida se mejoraron en composiciones sin o con baja concentración de fenol con

- relación a aquellas con fenol a 5.5 mg/ml. Los resultados muestran que la estabilidad física y la estabilidad química de la semaglutida también se mejoraron en las composiciones sin fenol que comprenden el tampón de dihidrato de citrato de trisodio o ningún tampón o cloruro de sodio como agente isotónico, con relación a aquellas con fenol. Se mejoró la estabilidad química y física para las composiciones con 0.1 mg/ml de fenol con relación a las composiciones con 5.5 mg/ml de fenol y similares a las composiciones sin fenol. Esto se demostró para composiciones con pH 7.0-7.8 y concentración de semaglutida de 0.1-10 mg/ml.

Tabla 6. Composiciones probadas en el Ejemplo 3

Comp. Núm.	Contenido de la composición				
	Semaglutida (mg/ml)	Fenol (mg/ml)	Tampón	Agente isotónico	pH
1	0.5	0	Fos*	PG**	7.0
2	0.5	0.1	Fos	PG	7.0
3	0.5	5.5	Fos	PG	7.0
4	0.5	0	Fos	PG	7.4
5	0.5	0.1	Fos	PG	7.4
6	0.5	5.5	Fos	PG	7.4
7	0.5	0	Fos	PG	7.8
8	0.5	0.1	Fos	PG	7.8
9	0.5	5.5	Fos	PG	7.8
10	10	0	Fos	PG	7.0
11	10	0.1	Fos	PG	7.0
12	10	5.5	Fos	PG	7.0
13	10	0	Fos	PG	7.4
14	10	0.1	Fos	PG	7.4
15	10	5.5	Fos	PG	7.4
16	10	0	Fos	PG	7.8
17	10	0.1	Fos	PG	7.8
18	10	5.5	Fos	PG	7.8
19	0.1	0	Fos	PG	7.4

20	0.1	5.5	Fos	PG	7.4
21	0.5	0	Fos	Citrato***	7.4
22	0.5	5.5	Fos	Citrato	7.4
23	0.5	0	Fos	Ninguno#	7.4
24	0.5	5.5	Fos	Ninguno	7.4
25	0.5	0	NaCl ^{##}	PG	7.4
26	0.5	5.5	NaCl	PG	7.4

*) Fos: Dihidrato de hidrógeno fosfato de disodio, 1.42 mg/ml. **) PG: Propilenglicol, 14 mg/ml. ***) Citrato: Dihidrato de Citrato de trisodio, 2.35 mg/ml. #) Ninguno: No se añadieron excipientes farmacéuticos en forma de tampón. ##) NaCl: Cloruro de sodio 6.3 mg/ml.

5

Tabla 7. Estabilidad química de las composiciones de semaglutida, según se expresa por el contenido de proteínas de alto peso molecular (HMWP) y la suma de impurezas, después del almacenamiento a 30 °C de temperatura. Una concentración más baja de HMWP y una concentración de suma de impurezas corresponde a una mejor estabilidad química.

10

Composición Núm.	DS (mg/ml)	Fenol (mg/ml)	Estabilidad química			
			HMWP (%)		Suma de impurezas (%)	
			0 meses	30 °C 3 meses	0 meses	30 °C 3 meses
1 (pH 7.0)	0.5	0	0.1	0.3	3.1	7.0
2 (pH 7.0)	0.5	0.1	0.1	0.3	3.2	7.2
3 (pH 7.0)	0.5	5.5	0.1	1.4	3.2	7.8
4 (pH 7.4)	0.5	0	0.1	0.3	3.1	6.7
5 (pH 7.4)	0.5	0.1	0.1	0.3	3.2	6.6
6 (pH 7.4)	0.5	5.5	0.1	2.4	3.2	8.4
7 (pH 7.8)	0.5	0	0.1	0.2	3.1	6.5
8 (pH 7.8)	0.5	0.1	0.1	0.3	3.2	6.6

9 (pH 7.8)	0.5	5.5	0.1	4.8	3.1	10.6
10 (pH 7.0)	10	0	0.1	1.4	3.1	8.4
11 (pH 7.0)	10	0.1	0.1	0.7	3.1	7.7
12 (pH 7.0)	10	5.5	0.1	N/A ¹	3.0	N/A ¹
13 (pH 7.4)	10	0	0.1	0.9	3.1	7.8
14 (pH 7.4)	10	0.1	0.1	0.7	3.1	6.9
15 (pH 7.4)	10	5.5	0.1	0.8	3.0	6.9
16 (pH 7.8)	10	0	0.1	0.9	3.0	6.6
17 (pH 7.8)	10	0.1	0.1	0.6	3.1	6.8
18 (pH 7.8)	10	5.5	0.1	1.0	3.1	6.9
19 (DS bajo)	0.1	0	0.1	0.2	3.5	7.7
20 (DS bajo)	0.1	5.5	0.1	4.7	3.7	11.4
21 (citrato)	0.5	0	0.1	0.2	3.1	6.2
22 (citrato)	0.5	5.5	0.1	2.2	3.2	7.7
23 (sin buffer)	0.5	0	0.1	0.2	3.2	6.9
24 (sin buffer)	0.5	5.5	0.1	2.3	3.2	9.3
25 (NaCl)	0.5	0	0.1	0.3	3.1	6.4
26 (NaCl)	0.5	5.5	0.1	3.4	3.2	8.9

DS: Semaglutida. ¹No es físicamente estable > 1 mes a 30 °C.

Tabla 8. Estabilidad física de las composiciones de semaglutida expresadas mediante el ensayo de tioflavina T (ThT). Un tiempo de retraso más largo corresponde a una mejor estabilidad física.

Composición Núm.	Semaglutida (mg/ml)	Fenol (mg/ml)	Tiempo de retraso (horas)
1 (pH 7.0)	0.5	0	42
2 (pH 7.0)	0.5	0.1	63
3 (pH 7.0)	0.5	5.5	5
4 (pH 7.4)	0.5	0	>117
5 (pH 7.4)	0.5	0.1	>117
6 (pH 7.4)	0.5	5.5	87

7 (pH 7.8)	0.5	0	>117
8 (pH 7.8)	0.5	0.1	>117
9 (pH 7.8)	0.5	5.5	>117
10 (pH 7.0)	10	0	117
11 (pH 7.0)	10	0.1	>117
12 (pH 7.0)	10	5.5	25
13 (pH 7.4)	10	0	>117
14 (pH 7.4)	10	0.1	>117
15 (pH 7.4)	10	5.5	>117
16 (pH 7.8)	10	0	>117
17 (pH 7.8)	10	0.1	>117
18 (pH 7.8)	10	5.5	>117
19 (DS bajo)	0.1	0	>117
20 (DS bajo)	0.1	5.5	>117
21 (citrato)	0.5	0	>117
22 (citrato)	0.5	5.5	>117
23 (sin buffer)	0.5	0	>117
24 (sin buffer)	0.5	5.5	4
25 (NaCl)	0.5	0	>117
26 (NaCl)	0.5	5.5	8

Los resultados son un promedio de 8 muestras probadas. DS: Semaglutida.

Si bien determinadas características de la invención se han ilustrado y descrito en la presente descripción, muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes serán evidentes para un experto en la técnica. Por lo tanto, debe entenderse que las reivindicaciones adjuntas se destinan a cubrir todas estas modificaciones y cambios ya que caen dentro del verdadero espíritu de la invención.

5