

COMPOSICIONES ESTABLES DE SEMAGLUTIDA Y USOS DE LAS MISMAS

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se sabe que los péptidos GLP-1 son propensos a desarrollar falta de estabilidad en
soluciones líquidas, por ejemplo, falta de estabilidad física o química.

10 Por lo tanto, se desean composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden a los
péptidos GLP-1 con una estabilidad incluso mejor. Tal estabilidad mejorada puede ser
una estabilidad física y/o química y puede conducir a una vida útil mejorada de la
formulación farmacéutica.

COMPENDIO

En algunas modalidades, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas líquidas
que comprenden semaglutida e histidina. En algunas 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
20 farmacéutica como se define en la presente descripción para el uso en medicina.

DESCRIPCION

Se sabe que las composiciones líquidas que comprenden péptidos del péptido 1 similar
al glucagón (GLP-1) son propensas a desarrollar una falta de estabilidad, por ejemplo,
25 durante el almacenamiento y/o cuando se exponen a la luz. Durante el almacenamiento
de una composición farmacéutica líquida que comprende semaglutida, por ejemplo, en
una jeringa precargada o en un cartucho, se observa un aumento en la formación de
impurezas con el tiempo.

Los presentes inventores han observado que cuando está presente un estabilizador, tal
30 como histidina, en la composición líquida, se forma un bajo contenido de proteínas de
alto peso molecular (HMWP) y otras impurezas. Por lo tanto, la composición que
comprende al estabilizador de acuerdo con la presente invención tiene una estabilidad

química y/o física mejorada. La estabilidad mejorada da como resultado beneficios para el paciente en forma de una vida útil más prolongada y un período de uso más prolongado.

En algunas modalidades, el estabilizador es histidina. En algunas modalidades, la
5 composición comprende histidina en una concentración de 0,5-100 mM, tal como 1-50 mM o 5-15 mM. En algunas modalidades, la composición comprende 0,01-10 mg/ml de semaglutida. En algunas modalidades, la composición comprende opcionalmente fenol, por ejemplo, la composición comprende hasta 10 mg/ml de fenol, tal como 5,5 mg/ml. En algunas modalidades, la composición comprende menos del 0,01 % (p/p) de fenol,
10 tal como sin fenol. En algunas modalidades, la composición no comprende más del 0,01 % (p/p) de fenol, tal como sin fenol. En algunas modalidades, la composición tiene un pH en el intervalo de 6,0-10,0, tal como 7,0-7,8.

A menos que se indique de otra forma en la descripción, los términos presentados en forma singular incluyen, además, la situación en plural.

15 **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 necesite de las mismas.

En algunas modalidades la composición de la invención comprende 0,01-100 mg/ml de
20 semaglutida. En algunas modalidades la composición de la invención comprende 0,1-50 mg/ml, tal como 0,5-25 mg/ml o 1-15 mg/ml, de semaglutida. En algunas modalidades la composición de la invención comprende 0,1-10 mg/ml, tal como 0,5-5 mg/ml o 1-2 mg/ml, de semaglutida. En algunas modalidades la composición de la invención comprende 0,5 mg/ml de semaglutida.

25 En algunas modalidades, las composiciones de la invención comprenden un estabilizador. El término estabilizador se refiere en la presente descripción a un compuesto que minimiza la formación de impurezas en la composición, tales como HMWP u otras impurezas no convenientes generadas durante el almacenamiento en comparación con una composición sin la presencia del estabilizador. En algunas
30 modalidades, el estabilizador es histidina. Las HMWP se refieren a proteínas de alto peso molecular y pueden determinarse como se describe en el Ensayo (I) en Métodos Generales y Caracterización. El término "otras impurezas no convenientes generadas

durante el almacenamiento" se refiere a "impurezas hidrófobas 1" o "impurezas hidrófobas 2" y puede determinarse como se describe en el Ensayo (II) en Métodos Generales y Caracterización.

5 En algunas modalidades, la composición de la invención comprende histidina como estabilizador en una concentración de 1-50 mM, tal como 5-20 mM. En algunas modalidades, la composición comprende de 0,5-15 mM de histidina como estabilizador. En algunas modalidades, la composición de la invención comprende 10 mM de histidina. En una modalidad específica, el estabilizador es histidina en una concentración de 10 mM.

10 En algunas modalidades, la composición 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 de la invención tiene un pH en el intervalo de pH 6,5-8,5, tal como pH 7,0-7,8. En una modalidad particular, el pH de la composición es de 7,4.

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

En algunas modalidades, la composición de la invención comprende un agente isotónico, tal como 1,2-propanodiol (propilenglicol).

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
20 tampón fosfato es un tampón fosfato de sodio, tal como un tampón de dihidrato de hidrogenofosfato disódico. En algunas modalidades, la histidina añadida como estabilizador también puede actuar como tampón.

En algunas modalidades, la composición de la invención comprende opcionalmente un conservante, por ejemplo, fenol en una concentración de hasta 10 mg/ml, tal como 5,5
25 mg/ml de fenol. En algunas modalidades, la composición comprende fenol en una concentración de 0,1 mg/ml a 5,5 mg/ml. En algunas modalidades, la composición de la invención no comprende conservante, tal como sin fenol. En algunas modalidades, la composición líquida comprende menos del 0,01 % (p/p) de fenol, tal como sin fenol. En algunas modalidades, la composición líquida comprende no más del 0,01 % (p/p) de
30 fenol, tal como sin fenol.

En algunas modalidades, la composición de la invención es una composición líquida en forma de solución, tal como una solución acuosa, es decir, que comprende agua. 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.

En algunas modalidades, la composición comprende semaglutida, un agente isotónico e histidina. En algunas modalidades, la composición comprende semaglutida, un agente isotónico e histidina, en donde la concentración de histidina es de 0,5-100 mM y en donde el pH de la composición está en el intervalo de 6,0-10,0. En algunas modalidades, la composición comprende semaglutida en una concentración de 0,5-15 mg/ml, histidina en una concentración de 0,5-100 mM y un agente isotónico, en donde el pH de la composición está en el intervalo de 6,0-10,0. En algunas modalidades, la composición comprende semaglutida en una concentración de 0,5-15 mg/ml, histidina en una concentración de 0,5-100 mM y propilenglicol, en donde el pH de la composición está en el intervalo de 6,0-10,0. En algunas modalidades, la composición comprende semaglutida en una concentración de 0,5-15 mg/ml, histidina en una concentración de 0,5-15 mM y propilenglicol, en donde el pH de la composición está en el intervalo de 6,0-10,0. En algunas modalidades, la composición comprende semaglutida en una concentración de 0,5-15 mg/ml, histidina en una concentración de 0,5-15 mM, un tampón fosfato y propilenglicol, en donde el pH de la composición está en el intervalo de 6,0-10,0.

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 humano (7-37), 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 al grupo carboxilato (-COO⁻) y/o uno o

más grupos amino (-NH_2) pueden protonarse al grupo -NH_3^+ . 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 administración subcutánea, por ejemplo, para administración por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa precargada, tal como una jeringa precargada con una aguja con clavija. En algunas modalidades, el medio de administración es una pluma duradera o una pluma precargada.

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 para el uso. En algunas modalidades, las instrucciones para el 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, la composición farmacéutica está en una jeringa precargada o en un cartucho que se inserta en el dispositivo de inyección. Un ejemplo de una jeringa precargada es una jeringa precargada con una aguja con clavija, tal como una jeringa de vidrio o una jeringa de polímero. En algunas modalidades, la jeringa precargada con una aguja con clavija es una jeringa de vidrio. En algunas modalidades, la jeringa precargada con una aguja con clavija es una jeringa polimérica. En algunas modalidades, el dispositivo de inyección es una pluma duradera o 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 el uso 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;
- 5 (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
10 ejemplo, mediante la disminución de la ingesta de alimentos, reducción 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.
- 15 (iv) prevención y/o tratamiento de trastornos hepáticos, tales como esteatosis hepática, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), inflamación del hígado o hígado graso.
- 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
20 modalidades, la indicación es (iv). En algunas modalidades, la indicación es diabetes tipo 2 y/u obesidad.
- En algunas modalidades el método o uso comprende 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
25 modalidades, la indicación es (ii) y (iii). En algunas modalidades, la invención comprende la administración de una cantidad efectiva de un péptido GLP-1. En algunas modalidades, la invención se refiere a la administración de una cantidad efectiva de un péptido GLP-1. En una modalidad particular, la invención se refiere a la administración de una cantidad efectiva de semaglutida.
- 30 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 (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 .

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 o un humano pediátrico (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 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 disminución del peso corporal. En algunas modalidades, la invención se refiere al uso de la composición para la disminución del peso corporal. Un humano sujeto a disminución del peso corporal de acuerdo 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 disminución del peso corporal de acuerdo con la presente invención puede tener un IMC de ≥ 35 o un IMC de ≥ 40 . El término “disminución del peso corporal” puede incluir tratamiento o prevención de la obesidad y/o sobrepeso.

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).

5 **Modalidades de la invención**

Las siguientes son modalidades no limitantes de la invención:

1. Una composición farmacéutica líquida que comprende semaglutida e histidina.
2. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con la modalidad 1, que comprende semaglutida, un agente isotónico e histidina.
- 10 3. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición tiene forma de solución líquida.
4. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de histidina es 0,5-100 mM.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
15 la concentración de histidina es 0,5-15 mM.
6. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de histidina es 1-50 mM.
7. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de histidina es 2-20 mM.
- 20 8. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de histidina es 2-15 mM.
9. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de histidina es 5-15 mM.
10. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
25 la concentración de histidina es 10 mM.
11. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende menos del 0,01 % (p/p) de fenol.
12. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende no más de 0,01 % (p/p) de fenol.
- 30 13. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición no comprende fenol.

14. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-10, en donde la composición comprende un conservante tal como el fenol.
15. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-10 o 14, en donde la composición comprende fenol en una concentración de hasta 10 mg/ml.
- 5 16. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-10 o 14-15, en donde la composición comprende fenol en una concentración de 0,1-5,5 mg/ml.
17. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-10 o 14-16, en donde la composición comprende 5,5 mg/ml de fenol.
18. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
10 la 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.
19. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de semaglutida es 0,1-20 mg/ml de la composición.
20. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
15 la concentración de semaglutida es 0,1-10 mg/ml de la composición.
21. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de semaglutida es 0,5-5 mg/ml de la composición.
22. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la concentración de semaglutida es 0,5 mg/ml de la composición.
- 20 23. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la semaglutida tiene forma de una sal farmacéuticamente aceptable.
24. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
25. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
25 la composición comprende uno o más agentes para ajustar el pH, tal como HCl, NaOH o acetato.
26. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende un agente isotónico.
27. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
30 la composición comprende un tampón.
28. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende un tampón y/o un agente isotónico.

29. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el tampón está presente en una concentración de 0,01-50 mM de la composición.
30. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el tampón es un tampón de fosfato o histidina.
- 5 31. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el tampón se selecciona de dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato disódico, ácido fosfórico o fosfato de sodio.
32. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición comprende un agente isotónico presente en una concentración de 8
10 mg/ml a 50 mg/ml, tal como 14 mg/ml a 30 mg/ml de la composición.
33. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde el agente isotónico es propilenglicol.
34. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición no comprende conservantes.
- 15 35. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición tiene un pH en el intervalo de 6,0-10,0.
36. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición tiene un pH en el intervalo de 7,0-7,8.
37. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
20 la composición consiste en semaglutida, histidina y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en un tampón, un agente isotónico y un agente para ajustar el pH.
38. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición consiste en semaglutida, histidina, un tampón y un agente isotónico.
- 25 39. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición es para la administración parenteral.
40. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición es para la administración subcutánea.
41. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde
30 la composición está en una jeringa precargada o en un cartucho.
42. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición está en una jeringa precargada con una aguja con clavija.

43. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde la composición se administra mediante el uso de una pluma duradera o una pluma precargada.
- 5 44. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se generan menos impurezas durante el almacenamiento.
45. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se generan menos HMWP durante el almacenamiento.
46. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se generan menos impurezas hidrófobas 1 durante el almacenamiento.
- 10 47. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se generan menos impurezas hidrófobas 2 durante el almacenamiento.
48. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se generan menos impurezas después de la exposición a la luz.
49. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se obtiene una estabilidad química mejorada de la composición.
- 15 50. La composición de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores, en donde se obtiene una estabilidad física mejorada.
51. Un kit que comprende la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores y las instrucciones para el uso.
- 20 52. El kit de acuerdo con la modalidad 51, en donde el kit comprende un dispositivo de inyección para la administración de la composición farmacéutica a un sujeto.
53. El kit de acuerdo con cualquiera de las modalidades 51-52, en donde el dispositivo de inyección se selecciona del grupo que consiste en una pluma duradera y una pluma precargada.
- 25 54. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-50, para el uso como un medicamento.
55. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores 1-50 para el uso en el tratamiento de la diabetes o la obesidad.
56. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1-50 para el uso en el tratamiento de NASH.
- 30

57. Un método para la prevención o el tratamiento de la diabetes o la obesidad, en donde la composición farmacéutica como se define en cualquiera de las modalidades 1-50 se administra a un sujeto que necesite de la misma.
58. Un método para la prevención o el tratamiento de NASH, en donde la composición farmacéutica como se define en cualquiera de las modalidades 1-50 se administra a un sujeto que necesite de la misma.

Ejemplos

Métodos Generales y Caracterización

10 *Preparación de las composiciones de semaglutida:*

A menos que se indique de cualquier otra manera, las composiciones de semaglutida se prepararon al disolver el tampón (por ejemplo, dihidrato de hidrógeno fosfato disódico), agente isotónico (propilenglicol) y fenol (opcionalmente) y opcionalmente un estabilizador (histidina) 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. Las composiciones que comprenden semaglutida e histidina se añadieron a una jeringa precargada (Ompi #7600002.8506) o a un cartucho.

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

La determinación del contenido de HMWP se realizó mediante el uso de la 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 semaglutida (es decir, picos de HMWP), con relación al área total de HMWP y los picos del monómero de semaglutida. Los resultados se presentan como valores absolutos y/o como % del aumento por mes.

30 *Ensayo (II): Determinación de las impurezas hidrófobas 1 y 2 de las composiciones de semaglutida*

La determinación de las impurezas hidrófobas 1 y 2 de las composiciones de semaglutida se realizó mediante el uso de la cromatografía líquida de alta resolución en

fase inversa (RP-HPLC). El método RP-HPLC se realizó en una columna Kinetex C18 comenzando con una elución isocrática seguida de una elución en gradiente mediante el uso del eluyente A (tampón fosfato 0,09 M al 90 %, pH 3,6 y acetonitrilo al 10 %) y eluyente B (acetonitrilo al 60 % e isopropanol al 20 %) de aproximadamente 50:50 a 10:90 y de nuevo a aproximadamente 50:50 de A:B. La detección se realizó a 210 nm.

Las impurezas hidrófobas 1 se calcularon como el área de todos los picos que eluían entre la semaglutida y el inicio del gradiente final en el cromatograma con relación al área total de todos los picos. Las impurezas hidrófobas 2 se calcularon como el área de todos los picos que eluían en el gradiente final en el cromatograma con relación al área total de todos los picos.

Ensayo (III): 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 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 mediante la agregación de proteínas solubles y dominadas mediante 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 terapéuticas. 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. La 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 las muestras. Las alícuotas de la 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 conveniente. 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 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.

Ejemplo 1:

Las composiciones que comprenden semaglutida se probaron en este ejemplo. Las composiciones probadas contenían semaglutida (0,5 mg/ml), propilenglicol (18,5 mg/ml), dihidrato de hidrogenofosfato disódico (1,42 mg/ml) y opcionalmente histidina (10 mM) como se especifica en la Tabla 1, a pH 7,4 en una solución acuosa. Las composiciones se prepararon como se describió en Métodos Generales y Caracterización y las composiciones de semaglutida se añadieron a una jeringa precargada con aguja con clavija (volumen de llenado 0,5 ml). Las jeringas cargadas se almacenaron a 30 °C o 37 °C y la estabilidad química se siguió en el tiempo. Algunas

composiciones se expusieron a luz artificial durante 96 horas a 1000 lux. Después de la exposición a la luz, se siguió la estabilidad química durante el almacenamiento a 37 °C (también denominado en la presente descripción “37 °C + luz”). La estabilidad química se determinó por medición de la formación de HMWP como se describió en el Ensayo (I) después del almacenamiento a 30 °C, 37 °C y 37 °C + luz; los resultados se proporcionan en la Tabla 2. La formación de impurezas hidrófobas 1 y 2 se determinó como se describió en el Ensayo (II) después del almacenamiento a 30 °C, 37 °C y 37 °C + luz; los resultados se proporcionan en las Tablas 3 y 4.

Los resultados dados en las Tablas 2, 3 y 4 muestran sorprendentemente que la estabilidad química de la semaglutida mejora cuando la histidina está presente en la composición con y sin exposición a la luz.

Tabla 1. Composiciones probadas en el Ejemplo 1

Núm. de la Composición	Descripción
1	sin histidina
2	Histidina 10 mM

Tabla 2. Formación de HMWP en composiciones de semaglutida en condiciones dadas.

Condiciones	Núm. de la Composición	HMWP (%)			
		0 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas
30 °C	1 (sin histidina)	0,1	0,3	0,4	-
	2 (histidina 10 mM)	0,1	0,2	0,2	-
37 °C	1 (sin histidina)	0,1	0,4	0,7	0,9
	2 (histidina 10 mM)	0,1	0,2	0,3	0,4
37 °C + luz	1 (sin histidina)	0,2	0,6	0,8	-

concentración más baja de HMWP corresponde a una mejor estabilidad, es decir, la composición es químicamente más estable cuando la histidina está presente con y sin exposición a la luz.

Tabla 3. Formación de impurezas hidrófobas 2 en composiciones de semaglutida en condiciones dadas.

Condiciones	Núm. de la Composición	Impurezas hidrófobas 2 (%)			
		0 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas
30 °C	1 (sin histidina)	<0,1	0,2	0,7	-
	2 (histidina 10 mM)	<0,1	0,1	0,2	-
37 °C	1 (sin histidina)	<0,1	0,3	0,8	1,1
	2 (histidina 10 mM)	<0,1	0,1	0,4	0,4

a 30 °C, 37 °C y 37 °C + Luz, es decir, la composición es más estable cuando está presente histidina.

Tabla 4. Formación de impurezas hidrófobas 1 en composiciones de semaglutida en condiciones dadas.

Condiciones	Núm. de la Composición	Impurezas hidrófobas 1 (%)			
		0 semanas	4 semanas	8 semanas	12 semanas
30 °C	1 (sin histidina)	1,6	2,3	2,8	-
	2 (histidina 10 mM)	1,5	1,8	2,1	-
37 °C	1 (sin histidina)	1,6	3,0	4,6	5,7
	2 (histidina 10 mM)	1,5	2,5	3,3	4,5

Los resultados presentados en la Tabla 4 muestran que cuando la histidina está presente en la composición, se forman menos impurezas hidrófobas 1 durante el almacenamiento a 30 °C, 37 °C y 37 °C + Luz, es decir, la composición es químicamente más estable cuando está presente histidina.

Ejemplo 2:

Las composiciones que comprenden semaglutida se probaron en este ejemplo. Las composiciones probadas contenían semaglutida (0,5 mg/ml), propilenglicol (18,5 mg/ml), dihidrato de hidrogenofosfato disódico (1,42 mg/ml), fenol (0, 0,1 o 5,5 mg/ml) y opcionalmente histidina (10 mM) como se especifica en las Tablas 5-9, a pH 7,4 en una solución acuosa. Las composiciones se prepararon como se describió en Métodos Generales y Caracterización y las composiciones de semaglutida se añadieron a una jeringa precargada (PFS) con aguja con clavija (volumen de llenado 0,5 ml) o cartuchos de 1,5 ml (volumen de llenado 1,5 ml). Las jeringas o cartuchos cargados se almacenaron a 37 °C y la estabilidad química se siguió en el tiempo. Algunas composiciones se expusieron a luz artificial durante 96 horas a 1000 lux. Después de la exposición a la luz, se siguió la estabilidad química durante el almacenamiento a 37 °C. La estabilidad química se determinó por medición de la formación de HMWP como se describió en el Ensayo (I) después del almacenamiento a 37 °C y 37 °C + luz; los resultados se proporcionan en la Tabla 5. La formación de impurezas hidrófobas 1 y 2 se determinó como se describió en el Ensayo (II) después del almacenamiento a 37 °C y 37 °C + luz; los resultados se proporcionan en las Tablas 6 y 7. En la Tabla 8 se ofrece una descripción general de los resultados de estabilidad química calculados como % del aumento por mes. La estabilidad física expresada mediante el ensayo de Tioflavina T (ThT) se determinó mediante el Ensayo (II) descrito en la presente descripción y resultados dados en la Tabla 9.

De acuerdo con los resultados del Ejemplo 1, estos resultados muestran que la estabilidad química de la semaglutida mejora cuando la histidina está presente en la composición con y sin exposición a la luz. También se observa una estabilidad química mejorada en presencia de histidina independientemente del empaque primario (jeringa precargada o cartucho).

En cuanto a la estabilidad física, los resultados presentados en la Tabla 9 muestran que se obtiene un mayor tiempo de retardo para composiciones con histidina en presencia de 5,5 mg/ml de fenol con o sin exposición a la luz, es decir, la composición es más estable físicamente cuando está presente la histidina.

Tabla 5. Formación de HMWP en composiciones de semaglutida en condiciones dadas

5	Histidina 10 mM (sí/no)	Empaque primario (PFS/cartucho)	Fenol (mg/ml)	Exposición a la luz (sí/no)	HMWP (%) durante el almacenamiento a 37 °C (meses)			
					0	1	2	3
10	No	PFS	0	No	0,1	0,6	0,8	0,9
	No	Cartucho	0	No	0,1	0,2	0,3	0,5
	Sí	PFS	0	No	0,1	0,2	0,7	0,5
	Sí	Cartucho	0	No	0,1	0,2	0,3	0,5
15	Sí	Cartucho	0	Sí	0,2	0,3	0,5	0,7
	No	Cartucho	5,5	No	0,2	2,0	3,9	5,8
	No	PFS	5,5	No	0,2	2,3	4,4	6,2
	No	Cartucho	5,5	Sí	0,4	2,3	4,1	6,2
20	Sí	Cartucho	5,5	No	0,1	0,3	0,6	1,3
	Sí	PFS	5,5	No	0,1	0,4	1,0	2,0
	Sí	Cartucho	5,5	Sí	0,2	0,4	1,0	1,8
	No	Cartucho	0,1	No	0,1	0,2	0,4	0,5
25	Sí	Cartucho	0,1	No	0,1	0,2	0,3	0,5

Tabla 6. Formación de impurezas hidrófobas 2 en composiciones de semaglutida en condiciones dadas

5	Histidina 10 mM (sí/no)	Empaque primario (PFS/cartucho)	Fenol (mg/ml)	Exposición a la luz (sí/no)	Impurezas hidrófobas 2 (%) durante el almacenamiento a 37 °C (meses)			
					0	1	2	3
10	No	PFS	0	No	0,1	0,6	0,7	1,0
	No	Cartucho	0	No	<0,1	0,3	0,5	0,6
	Sí	PFS	0	No	<0,1	0,3	0,6	0,8
	Sí	Cartucho	0	No	<0,1	0,2	0,4	0,5
	Sí	Cartucho	0	Sí	0,1	0,3	0,5	0,6
15	No	Cartucho	5,5	No	<0,1	1,4	2,7	4,0
	No	PFS	5,5	No	0,1	1,7	2,9	4,4
	No	Cartucho	5,5	Sí	0,2	1,6	2,8	4,7
	Sí	Cartucho	5,5	No	<0,1	0,2	0,6	1,3
	Sí	PFS	5,5	No	<0,1	0,3	1,4	1,4
	Sí	Cartucho	5,5	Sí	0,1	0,4	0,9	1,5
20	No	Cartucho	0,1	No	<0,1	0,2	0,4	0,6
	Sí	Cartucho	0,1	No	<0,1	0,2	0,4	0,4

25

Tabla 7. Formación de impurezas hidrófobas 1 en composiciones de semaglutida en condiciones dadas

5	Histidina 10 mM (sí/no)	Empaque primario (PFS/cartucho)	Fenol (mg/ml)	Exposición a la luz (sí/no)	Impurezas hidrófobas 1 (%) durante el almacenamiento a 37 °C (meses)			
					0	1	2	3
10	No	PFS	0	No	1,6	3,0	4,5	5,8
	No	Cartucho	0	No	1,6	2,8	4,3	5,6
	Sí	PFS	0	No	1,5	2,5	3,7	5,0
	Sí	Cartucho	0	No	1,5	2,4	3,7	4,8
	Sí	Cartucho	0	Sí	1,5	2,5	3,8	4,9
15	No	Cartucho	5,5	No	1,7	3,2	5,3	6,7
	No	PFS	5,5	No	1,7	3,4	5,5	6,9
	No	Cartucho	5,5	Sí	1,7	3,4	5,5	6,9
	Sí	Cartucho	5,5	No	1,6	2,6	4,0	5,4
	Sí	PFS	5,5	No	1,6	2,7	4,4	5,4
20	Sí	Cartucho	5,5	Sí	1,6	2,7	4,2	5,5
	No	Cartucho	0,1	No	1,5	2,8	4,4	5,6
	Sí	Cartucho	0,1	No	1,5	2,5	3,8	4,8

25

Tabla 8. Resumen de la estabilidad química expresada como % del aumento por mes para HMWP, impurezas hidrófobas 1 e impurezas hidrófobas 2

Empaque primario (PFS/cartucho)	Fenol (mg/ml)	Histidina 10 mM (sí/no)	Exposición a la luz (sí/no)	HMWP (%/mes)	Impurezas hidrófobas 1 (%/mes)	Impurezas hidrófobas 2 (%/mes)
Cartucho	0	No	No	0,13	1,32	0,17
Cartucho	0	Sí	No	0,13	1,10	0,14
Cartucho	0	Sí	Sí	0,17	1,12	0,17
Cartucho	0,1	No	No	0,14	1,36	0,17
Cartucho	0,1	Sí	No	0,13	1,09	0,11
Cartucho	5,5	No	No	1,83	1,67	1,27
Cartucho	5,5	No	Sí	1,88	1,73	1,44
Cartucho	5,5	Sí	No	0,38	1,25	0,39
Cartucho	5,5	Sí	Sí	0,53	1,29	0,46
PFS	0	No	No	0,25	1,38	0,27
PFS	0	Sí	No	0,17	1,14	0,23
PFS	5,5	No	No	1,96	1,73	1,38
PFS	5,5	Sí	No	0,62	1,28	0,49

Tabla 9. 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.

Los resultados son un promedio de 6 muestras probadas

5		Histidina 10 mM (sí/no)	Empaque primario (PFS/cartucho)	Fenol (mg/ml)	Exposición a la luz (sí/no)	Tiempo de retraso (horas)
		No	PFS	0	No	>166
10		No	Cartucho	0	No	>166
		Sí	PFS	0	No	>166
		Sí	Cartucho	0	No	>166
		Sí	Cartucho	0	Sí	>166
		No	Cartucho	5,5	No	100
15		No	PFS	5,5	No	97
		No	Cartucho	5,5	Sí	50
		Sí	Cartucho	5,5	No	>166
		Sí	PFS	5,5	No	149
		Sí	Cartucho	5,5	Sí	>166
20		No	Cartucho	0,1	No	>166
		Sí	Cartucho	0,1	No	>166

Ejemplo 3:

Las composiciones que comprenden semaglutida se probaron en este ejemplo. Las composiciones probadas contenían semaglutida (0,1, 0,5, 2,0, 5,0 y 10 mg/ml), propilenglicol (18,5 mg/ml), dihidrato de hidrogenofosfato disódico (1,42 mg/ml) y opcionalmente histidina (5 y 10 mM) como se especifica en la Tabla 10, a pH 7,4 en una solución acuosa. Las composiciones se prepararon como se describió en Métodos Generales y Caracterización y las composiciones de semaglutida se añadieron a una jeringa precargada (PFS) con aguja con clavija (volumen de llenado 0,5 ml). Las jeringas cargadas se almacenaron a 30 °C durante 3 meses y la estabilidad química se siguió en el tiempo. La estabilidad Química se determinó por medición de la formación

de HMWP como se describió en el Ensayo (I) después del almacenamiento a 30 °C. La formación de impurezas hidrófobas 1 y 2 se determinó como se describió en el Ensayo (II) después del almacenamiento a 30 °C. Los resultados calculados como % del aumento por mes se proporcionan en la Tabla 10.

- 5 **Tabla 10.** Resumen de la estabilidad química dada como % del aumento por mes para HMWP impurezas hidrófobas 1 y 2 durante el almacenamiento a 30 °C.

10

Histidina (mM)	Semaglutida (mg/ml)	HMWP (%/mes)	Impurezas hidrófobas 1 (%/mes)	Impurezas hidrófobas 2 (%/mes)
0	0,5	0,35	0,71	0,37
0	5	0,19	0,46	0,19
0	10	0,16	0,44	0,22
5	0,5	0,11	0,41	0,17
10	0,1	0,08	0,41	0,09
15	10	0,10	0,36	0,09
	10	0,08	0,40	0,10
	5	0,10	0,40	0,10
	10	0,12	0,39	0,18

- 20 Los resultados muestran que la estabilidad química de semaglutida mejora cuando la histidina está presente en la composición independientemente de la cantidad de semaglutida e independiente de la cantidad de histidina.

- De manera similar, las composiciones que comprenden 0,5 mg/ml de semaglutida, 18,5 mg/ml de propilenglicol, 1,42 mg/ml de dihidrato de hidrogenofosfato disódico con y
25 sin histidina 10 mM en solución acuosa a pH 7,4 se almacenaron a 30 °C durante tres meses en jeringas precargadas de diferentes proveedores. Los resultados mostraron que la estabilidad química de la semaglutida mejoró independientemente de qué jeringa/proveedor se usó.

- Aunque determinadas características de la invención se han ilustrado y descrito en la
30 presente descripción, muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes serán evidentes para los expertos en la técnica. Por lo tanto, debe entenderse que las

reivindicaciones adjuntas están destinadas a cubrir todas estas modificaciones y cambios dentro del verdadero espíritu de la invención.