

COMPOSICIÓN DEL PÉPTIDO GLP-1 Y SU USO

Área técnica

La presente invención se refiere al campo de los biofármacos y a una composición farmacéutica estable que contiene un péptido GLP-1.

Antecedentes de la técnica

El péptidosimilar al glucagón-1 (GLP-1) y sus análogos y derivados son muy eficaces en el tratamiento de la diabetes tipo 1 y tipo 2. Sin embargo, los péptidos GLP-1 tienden a presentar poca estabilidad en soluciones líquidas, como inestabilidad química. Por lo tanto, hay una necesidad de optimizar los sistemas de formulación para proporcionar una composición farmacéutica líquida de un péptido GLP-1 con buena estabilidad.

Resumen

La presente invención proporciona una composición farmacéutica líquida de un péptido GLP-1 que tiene una estabilidad química superior. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un kit que comprende la composición farmacéutica tal como se define en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica definida en el presente documento para uso médico.

En algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una formulación de péptido GLP-1 que es estable durante el almacenamiento y la administración. Una formulación estable es aquella en la que el péptido GLP-1 conserva sustancialmente su estabilidad física y química durante el almacenamiento, produce menos impurezas y genera menos proteínas de alto peso molecular en las condiciones de almacenamiento deseadas, y cumple con los requisitos de almacenamiento y administración de las formulaciones inyectables. Los principales factores que determinan la vida útil son, por lo general, la formación de subproductos y productos de degradación. Las formulaciones de la presente invención alcanzan estos niveles deseados de estabilidad.

Además de una estabilidad física y química suficiente, la formulación también debe poseer un valor de pH y una presión osmótica aceptables para su uso. En particular, las altas concentraciones de los ingredientes farmacéuticos activos pueden aumentar la agregación de la formulación. En algunas realizaciones de la presente invención, la formulación farmacéutica puede reducir la agregación de péptidos GLP dentro de un rango de concentración específico, proporcionando una formulación farmacéutica estable para péptidos GLP-1 desde concentraciones bajas hasta concentraciones elevadas.

Además, en algunas realizaciones de la invención, se ha optimizado la concentración de los componentes de la formulación con el fin de garantizar la comodidad del paciente durante la inyección, lo que proporciona una solución que alivia el dolor que siente el paciente.

En su aspecto más amplio, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica (la formulación de la presente invención) que comprende un péptido GLP-1 como ingrediente activo y una solución amortiguadora, un regulador de la presión osmótica y un antioxidante. La formulación de la presente invención es un líquido (por ejemplo, una solución acuosa). En algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una formulación

estable del péptido GLP-1 adecuada para la administración subcutánea.

Específicamente, el primer aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica líquida que comprende:

- a. un péptido GLP-1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptable;
- b. un regulador de la presión osmótica;
- c. un antioxidante; y
- d. una solución amortiguadora;

en donde, el péptido GLP-1 se selecciona entre los siguientes compuestos:

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-carboxinonadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiheneicosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[21-carboxiheneicosanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(23-carboxitricosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[23-carboxitricosanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -(23-carboxitricosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoil-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -(19-carboxinonadecanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoil-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -(21-carboxiheneicosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoil-[Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(19-carboxinonadecanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-carboxinonadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiheneicosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[21-carboxiheneicosanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Arg34]GLP-1-(7-37),

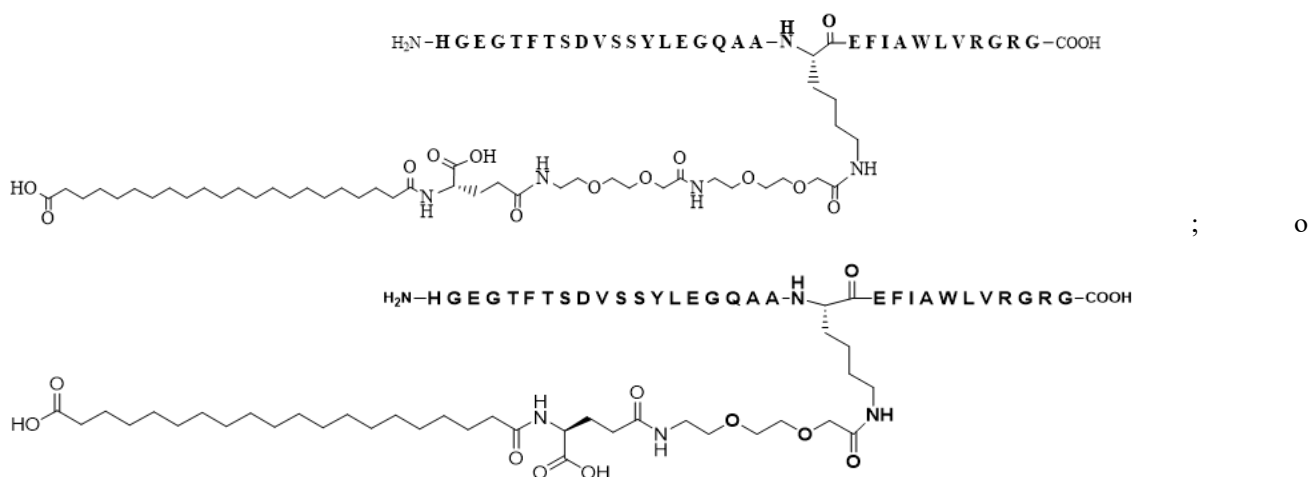
péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(23-carboxitricosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[23-carboxitricosanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi)acetyl][Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -(23-carboxitricosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoil-[Arg34]GLP-1-(7-37),

péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -(19-carboxinonadecanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoil-[Arg34]GLP-1-(7-37),

Preferentemente, el péptido GLP-1 es el siguiente compuesto:



En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende o no comprende un conservante, preferentemente la composición farmacéutica no comprende un conservante, preferentemente el conservante es fenol o m-cresol, preferentemente la composición farmacéutica no comprende fenol ni m-cresol.

En algunas realizaciones, la solución amortiguadora es al menos una seleccionada del grupo que consiste en una solución amortiguadora de ácido acético-acetato de sodio, una solución amortiguadora de ácido acético-acetato de potasio, una solución amortiguadora de ácido acético-acetato de amonio y una solución amortiguadora de fosfato, y preferentemente una solución amortiguadora de fosfato; preferentemente la solución amortiguadora de fosfato es Na₂HPO₄.

En algunas realizaciones, el regulador de la presión osmótica es NaCl o propilenglicol.

En algunas realizaciones, el antioxidante es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido ascórbico, metionina, ácido cítrico y ácido tartárico; preferentemente, el antioxidante se selecciona entre ácido cítrico y metionina; preferentemente, el ácido cítrico es ácido cítrico monohidrato.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende más de aproximadamente 0,5 mg/ml de Na₂HPO₄, preferentemente 0,5-20 mg/ml de Na₂HPO₄, 1-20 mg/ml de Na₂HPO₄, 1-10 mg/ml de Na₂HPO₄; más preferentemente 1-5 mg/ml de Na₂HPO₄, y aún más preferentemente 1,40 mg/ml, 1,41 mg/ml, 1,42 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4 mg/ml o 4,5 mg/ml de Na₂HPO₄.

En algunas realizaciones, la concentración de NaCl es superior a aproximadamente 0,5 mg/ml, preferentemente más de 1 mg/ml, preferentemente 1-30 mg/ml, 3-25 mg/ml, 5-15 mg/ml, 5-10 mg/ml, 5 mg/ml, 5,5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 8,10 mg/ml, 8,15 mg/ml, 8,20 mg/ml, 8,25 mg/ml, 8,30 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml.

En algunas realizaciones, la concentración de propilenglicol es superior a aproximadamente 1 mg/ml, preferentemente más de aproximadamente 2 mg/ml, preferentemente 5-25 mg/ml, 10-20 mg/ml, 12-18 mg/ml, 13 mg/ml, 13,5 mg/ml, 14 mg/ml, 14,5 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml o 17 mg/ml.

En algunas realizaciones, la concentración del antioxidante es superior a aproximadamente 0,5 mM, preferentemente más de 1 mM, preferentemente 1-25 mM, 1-20 mM, 1-15 mM, 1-10 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM o 9 mM.

En algunas realizaciones, el antioxidante se selecciona entre el ácido cítrico a una concentración de aproximadamente 1-25 mM, preferentemente a una concentración de 1-20 mM, 1-15 mM o 1-10 mM; preferentemente a una

concentración de aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM o 9 mM; preferentemente, el ácido cítrico debe ser ácido cítrico monohidrato.

En algunas realizaciones, la concentración del péptido GLP-1 es de al menos aproximadamente 1 mg/ml, preferentemente 2 mg/ml, 1-80 mg/ml, 1-70 mg/ml, 1-65 mg/ml, 1-60 mg/ml, 2-60 mg/ml o 2-50 mg/ml; más preferentemente, la concentración es de aproximadamente 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml, 26 mg/ml, 27 mg/ml, 28 mg/ml, 29 mg/ml, 30 mg/ml, 31 mg/ml, 32 mg/ml, 33 mg/ml, 34 mg/ml, 35 mg/ml, 36 mg/ml, 37 mg/ml, 38 mg/ml, 39 mg/ml, 40 mg/ml, 41 mg/ml, 42 mg/ml, 43 mg/ml, 44 mg/ml, 45 mg/ml, 46 mg/ml, 47 mg/ml, 48 mg/ml, 49 mg/ml o 60 mg/ml; aún más preferentemente de aproximadamente 2 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 15 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 30 mg/ml, 36 mg/ml o 48 mg/ml; y con mayor preferencia aún, de aproximadamente 3 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 36 mg/ml o 48 mg/ml.

En algunas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, más preferentemente de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 8,5, aún más preferentemente de aproximadamente 7,1 a aproximadamente 8,3, aún más preferentemente de aproximadamente 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1 u 8,2.

Otra realización de la presente invención también proporciona una composición farmacéutica líquida que comprende: aproximadamente 1-60 mg/ml, preferentemente 1-70 mg/ml, 1-65 mg/ml, 1-60 mg/ml, 2-60 mg/ml o 2-50 mg/ml; más preferentemente 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml, 26 mg/ml, 27 mg/ml, 28 mg/ml, 29 mg/ml, 30 mg/ml, 31 mg/ml, 32 mg/ml, 33 mg/ml, 34 mg/ml, 35 mg/ml, 36 mg/ml, 37 mg/ml, 38 mg/ml, 39 mg/ml, 40 mg/ml, 41 mg/ml, 42 mg/ml, 43 mg/ml, 44 mg/ml, 45 mg/ml, 46 mg/ml, 47 mg/ml, 48 mg/ml o 49 mg/ml; aún más preferentemente 2mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 15 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 30 mg/ml, 36 mg/ml o 48 mg/ml; y aún más preferentemente 3 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 36 mg/ml o 48 mg/ml del péptido *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiheneicosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) o péptido *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[19-carboxinonadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37);

aproximadamente 1-30 mg/ml, preferentemente 3-25 mg/ml, preferentemente 5-15 mg/ml, y preferentemente 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 8,10 mg/ml, 8,15 mg/ml, 8,20 mg/ml, 8,25 mg/ml, 8,30 mg/ml, 8,50 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml de NaCl;

aproximadamente 1-25 mM, preferentemente 1-20 mM, más preferentemente 1-15 mM, aún más preferentemente 1-10 mM, y aún más preferentemente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM o 9 mM de ácido cítrico; aproximadamente 1-20 mg/ml, preferentemente 1-10 mg/ml, más preferentemente 1-5 mg/ml, y aún más preferentemente 1,42 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4 mg/ml o 4,5 mg/ml de Na₂HPO₄; y

el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, más preferentemente de

7,0 a 8,5, aún más preferentemente de 7,1 a 8,3, y aún más preferentemente de 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1 u 8,2.

Otra realización de la presente invención también proporciona una composición farmacéutica líquida que comprende: aproximadamente 1-60 mg/ml, preferentemente 1-70 mg/ml, 1-65 mg/ml, 1-60 mg/ml, 2-60 mg/ml o 2-50 mg/ml; más preferentemente 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml, 26 mg/ml, 27 mg/ml, 28 mg/ml, 29 mg/ml, 30 mg/ml, 31 mg/ml, 32 mg/ml, 33 mg/ml, 34 mg/ml, 35 mg/ml, 36 mg/ml, 37 mg/ml, 38 mg/ml, 39 mg/ml, 40 mg/ml, 41 mg/ml, 42 mg/ml, 43 mg/ml, 44 mg/ml, 45 mg/ml, 46 mg/ml, 47 mg/ml, 48 mg/ml o 49 mg/ml; aún más preferentemente 2 mg/ml, 3 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 15 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 30 mg/ml, 36 mg/ml o 48 mg/ml; y aún más preferentemente 3 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 36 mg/ml o 48 mg/ml de péptido *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiheneicosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) o péptido *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[19-carboxinonadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37);

aproximadamente 5-25 mg/ml, preferentemente 10-20 mg/ml, 12-18 mg/ml, y preferentemente 13 mg/ml, 13,5 mg/ml, 14 mg/ml, 14,5 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml o 17 mg/ml de propilenglicol;

aproximadamente 1-25 mM, preferentemente 1-20 mM, más preferentemente 1-15 mM, aún más preferentemente 1-10 mM, y aún más preferentemente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM o 9 mM de ácido cítrico; aproximadamente 1-20 mg/ml, preferentemente 1-10 mg/ml, más preferentemente 1-5 mg/ml, y aún más preferentemente 1,42 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4 mg/ml o 4,5 mg/ml de Na₂HPO₄; y

el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5, más preferentemente de 7,0 a 8,5, aún más preferentemente de 7,1 a 8,3, y aún más preferentemente de 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1 u 8,2.

Otra realización de la presente invención también proporciona una composición farmacéutica líquida que comprende: aproximadamente 3 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 30 mg/ml, 36 mg/ml, 48 mg/ml o 60 mg/ml de péptido *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiheneicosanoilamino)-4(*S*)-carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) o péptido *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(4-[19-carboxinonadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37); aproximadamente 7 mg/ml, 8 mg/ml, 8,10 mg/ml, 8,15 mg/ml, 8,20 mg/ml, 8,25 mg/ml, 8,30 mg/ml, 8,50 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml de NaCl;

aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM o 10 mM de ácido cítrico;

aproximadamente 1,42 mg/ml de Na₂HPO₄; y

el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 7,3.

Otra realización de la presente invención también proporciona una composición farmacéutica líquida que comprende: aproximadamente 3 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 30 mg/ml, 36 mg/ml o 48 mg/ml de péptido *N*-ε²⁶-[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiheneicosanoilamino)-4(*S*)-

carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) o péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-carboxinonadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37); aproximadamente 14 mg/ml de propilenglicol;

aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM o 10 mM de ácido cítrico;

aproximadamente 1,42 mg/ml de Na_2HPO_4 ; y

el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 7,3.

El segundo aspecto de la presente invención proporciona un producto farmacéutico que comprende un recipiente y la composición farmacéutica líquida del primer aspecto de la presente invención colocada en el recipiente; preferentemente, el recipiente se selecciona entre un dispositivo tipo pluma para inyección, un dispositivo de inyección automático, una jeringa y un vial.

En otra realización de la presente invención se proporciona un producto farmacéutico que comprende un recipiente y una composición farmacéutica líquida colocada en el recipiente, el recipiente se desoxigena y se llena con nitrógeno antes de colocar la composición farmacéutica líquida y/o durante el proceso de colocación de la composición farmacéutica líquida en el recipiente y/o después de colocar la composición farmacéutica líquida en el recipiente; la composición farmacéutica líquida comprende:

aproximadamente 3 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 36 mg/ml, 48 mg/ml o 60 mg/ml de péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiheneicosanoilamino)-4(*S*)-

carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) o péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-carboxinonadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37);

aproximadamente 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 8,10 mg/ml, 8,15 mg/ml, 8,20 mg/ml, 8,25 mg/ml, 8,30 mg/ml, 8,50 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml de NaCl ;

aproximadamente 1,42 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4 mg/ml, o 4,5 mg/ml de Na_2HPO_4 ; y

el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,6 o 7,7.

En otra realización de la presente invención se proporciona un producto farmacéutico que comprende un recipiente y una composición farmacéutica líquida colocada en el recipiente, el recipiente se desoxigena y se llena con nitrógeno antes de colocar la composición farmacéutica líquida y/o durante el proceso de colocación de la composición farmacéutica líquida en el recipiente y/o después de colocar la composición farmacéutica líquida en el recipiente; la composición farmacéutica líquida comprende:

aproximadamente 2-60 mg/ml, preferentemente 3 mg/ml, 6 mg/ml, 12 mg/ml, 18 mg/ml, 24 mg/ml, 36 mg/ml o 48 mg/ml de péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(2-[2-(2-[4-(21-carboxiheneicosanoilamino)-4(*S*)-

carboxibutanoilamino]etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) o péptido $N\text{-}\epsilon^{26}$ -[2-(2-[2-(4-[19-carboxinonadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi]acetil][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37);

aproximadamente 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml o 17 mg/ml de propilenglicol;

aproximadamente 1,42 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4 mg/ml, o 4,5 mg/ml de Na_2HPO_4 ; y

el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,6 o 7,7.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica líquida comprende además aproximadamente 0,005 mM-25 mM, preferentemente 0,01 mM-10 mM, y aún más preferentemente 0,1 mM-2,0 mM de ácido cítrico o metionina.

En algunas realizaciones, la desoxigenación del recipiente se logra llenándolo con un gas inerte; preferentemente, el gas inerte es nitrógeno.

En algunas realizaciones, el recipiente es un dispositivo tipo pluma para inyección, un dispositivo de inyección automático, una jeringa o un vial.

La composición farmacéutica según el primer aspecto de la presente invención, o el producto farmacéutico según el segundo aspecto de la presente invención, en donde la composición farmacéutica es para administración parenteral; preferentemente, la administración parenteral es subcutánea.

Un tercer aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende un producto farmacéutico líquido e instrucciones para su uso, en donde la composición del líquido es la definida en el primer aspecto de la presente invención.

Otra realización de la presente invención proporciona un kit que comprende una composición farmacéutica líquida y un dispositivo de inyección, en donde la composición líquida es tal como se define en el primer aspecto de la presente invención, y el dispositivo de inyección es para administrar la composición a un sujeto, en donde el dispositivo de inyección se selecciona entre una pluma duradera y un dispositivo de pluma precargada para inyección.

Uso de la composición farmacéutica del primer aspecto de la presente invención, o del producto farmacéutico del segundo aspecto de la presente invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes, la obesidad, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson; preferentemente mediante la administración de la composición farmacéutica según el primer aspecto de la presente invención a un sujeto que la necesite una vez por semana, una vez cada dos semanas o con menor frecuencia.

La composición farmacéutica del primer aspecto de la presente invención, o el producto farmacéutico del segundo aspecto de la presente invención, para su uso en el tratamiento de la diabetes, la obesidad, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson; preferentemente, la composición farmacéutica según el primer aspecto de la presente invención se administra a un sujeto que la necesita una vez por semana, una vez cada dos semanas o con menor frecuencia.

El cuarto aspecto de la presente invención proporciona un método para tratar la diabetes, la obesidad, la enfermedad del hígado graso no alcohólico, la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, el método comprende administrar la composición farmacéutica del primer aspecto de la presente invención, o el producto farmacéutico del segundo aspecto de la presente invención, a un sujeto que lo necesite; preferentemente, administrar la composición farmacéutica del primer aspecto de la presente invención a un sujeto que lo necesite una vez por semana, una vez cada dos semanas o con menor frecuencia.

El quinto aspecto de la presente invención proporciona un método para preparar la composición farmacéutica del primer aspecto, en donde el método comprende:

- (1) disolver una cantidad formulada de una solución amortiguadora, un regulador de la presión osmótica o un antioxidante en agua;
- (2) disolver una cantidad formulada de un péptido GLP-1 en la solución obtenida en el paso (1) y ajustar el pH

utilizando hidróxido de sodio o ácido clorhídrico diluido;

(3) finalmente esterilizar la solución obtenida en el paso (2) filtrándola con un filtro estéril de 0,22 µm.

Otra realización de la presente invención proporciona un método para preparar la composición farmacéutica según el primer aspecto de la presente invención, en donde el método comprende:

mezclar el péptido GLP-1, la solución amortiguadora, el regulador de la presión osmótica y el antioxidante según la formulación;

Preferentemente, el método comprende, además:

esterilizar la mezcla obtenida en el paso (2); preferentemente, la mezcla obtenida en el paso (2) se esteriliza filtrándola a través de un filtro estéril de 0,22 µm.

Definiciones

Para comprender mejor la presente invención, a continuación, se proporcionan definiciones y explicaciones de términos relevantes.

Péptido GLP-1

El término "péptido GLP-1" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a "análogos de GLP-1" o "análogos de GLP-1", es decir, péptidos o compuestos que son variantes del péptido similar al glucagón-1 humano (GLP-1(7-37)), en donde uno o más residuos de aminoácidos de GLP-1(7-37) se sustituyen, o uno o más residuos de aminoácidos se eliminan, o se agregan uno o más residuos de aminoácidos. Específicamente, la secuencia GLP-1(7-37) se muestra en la SEQ ID NO: 1 en la lista de secuencias. Los péptidos cuya secuencia se muestra en la SEQ ID NO: 1 también puede denominarse GLP-1 "nativo" o GLP-1 (7-37) "nativo".

En la lista de secuencias, el primer residuo de aminoácidos (histidina) de la SEQ ID NO:1 tiene el número 1. Sin embargo, en el texto siguiente, siguiendo la convención establecida en la técnica, este residuo de histidina tiene el número 7, y los siguientes residuos de aminoácidos están numerados secuencialmente y finalizan con glicina como el número 37. Por lo tanto, en general, la numeración de los residuos de aminoácidos o la numeración de la posición para la secuencia GLP-1(7-37) analizada en este documento se refiere a la secuencia que comienza con His en la posición 7 y termina con Gly en la posición 37.

El péptido [Gly8, Arg34] GLP-1-(7-37) es un análogo de GLP-1 en donde Gly y Arg están sustituidos en las posiciones 8 y 34, respectivamente, en relación con GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1). El péptido [Arg34]GLP-1-(7-37) es un análogo de GLP-1 que tiene Arg en la posición 34 correspondiente a GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 1). Específicamente, la secuencia de aminoácidos del péptido [Gly8, Arg34] GLP-1-(7-37) se muestra como SEQ ID NO: 2 en la lista de secuencias.

El péptido GLP-1 que se describe en el presente documento puede prepararse según el método descrito en el documento WO2021136303.

En el contexto de los péptidos GLP-1 o sus análogos, el término "derivado" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un péptido GLP-1 o análogo modificado químicamente en donde uno o más sustituyentes están unidos covalentemente a dichos péptidos. Tales sustituyentes también pueden denominarse cadenas laterales.

A menos que se indique lo contrario, las referencias a la acilación de los residuos de lisina deben entenderse como que ocurren en el grupo ε-amino.

El término “péptido”, cuando se utiliza en referencia a los análogos de GLP-1 como los de la presente invención, se refiere a un compuesto que comprende una secuencia de aminoácidos interconectados por enlaces amida (o peptídicos).

En una realización específica, el péptido está compuesto en gran parte o principalmente de aminoácidos interconectados mediante enlaces amida (por ejemplo, al menos 50%, 60%, 70%, 80% o al menos 90% en masa molar). En otra realización específica, el péptido está compuesto por aminoácidos interconectados mediante enlaces peptídicos.

Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amino y un grupo carboxilo, y que opcionalmente pueden llevar uno o más grupos adicionales, comúnmente conocidos como cadenas laterales.

El término "aminoácidos" comprende aminoácidos proteicos (codificados por el código genético, incluidos los aminoácidos naturales y los aminoácidos estándar), aminoácidos no proteicos (no se encuentran en proteínas y no están codificados por el código genético estándar) y aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos no proteicos son aminoácidos que pueden incorporarse en un péptido mediante enlaces peptídicos, pero no son aminoácidos proteicos. Los aminoácidos sintéticos no proteicos incluyen aquellos producidos por síntesis química, es decir, los isómeros D de aminoácidos codificados por el código genético, como la D-alanina y la D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), ácido 3-aminometilbenzoico, ácido o-aminobenzoico, histidina desamidada, análogos β de aminoácidos como la β -alanina, la D-histidina, la histidina desamidada, la 2-aminohistidina, la β -hidroxihistidina y la homohistidina, etc.

Los ejemplos no restrictivos de aminoácidos no codificados por el código genético incluyen el ácido γ -carboxiglutámico, la ornitina, la D-alanina, la D-glutamina y la fosfoserina. Algunos ejemplos no limitantes de aminoácidos sintéticos incluyen los isómeros D de aminoácidos, como la D-alanina y la D-leucina, el Aib (ácido α -aminoisobutírico), la β -alanina y la des-amino-histidina (desH, también conocida como ácido imidopropiónico, abreviado como Imp).

En el texto siguiente, todos los aminoácidos no explícitamente etiquetados como isómeros ópticos se entienden que se refieren al isómero L (a menos que se especifique lo contrario).

El término “estable” se refiere al hecho de que todas las proteínas que contiene esencialmente conservan su actividad física, química y biológica después del almacenamiento en el rango de temperatura especificado, como de 0 a 40 °C. El anticuerpo presente en la formulación no mantiene el 100% de su actividad física, química y biológica después de un cierto período de almacenamiento, pero la formulación aún puede considerarse estable. Si, después de un período de almacenamiento determinado, el anticuerpo conserva aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o más del 99 % de su estructura y función, la formulación puede considerarse "estable".

El término “composición farmacéutica estable” se refiere a una composición de medicamento que contiene un péptido GLP-1, como una solución o suspensión, en donde la composición contiene al menos un 80 % (p/v) de dicho péptido GLP-1 después del almacenamiento (por ejemplo, después de 3 meses de almacenamiento estático a 25 °C). Las condiciones de almacenamiento para las pruebas de estabilidad pueden ser de 2 a 8 °C, como por ejemplo 5 °C, o al menos 2,5 años a 5 °C. Como alternativa, las condiciones de almacenamiento para las pruebas de estabilidad pueden ser de al menos 4 semanas, como por ejemplo 6 semanas o 3 meses, opcionalmente a 30 °C. Las condiciones de

almacenamiento para esta composición farmacéutica estable pueden ser de 1 o 2 años a 5 °C. Las condiciones de almacenamiento para esta composición farmacéutica estable pueden ser de 3 años a 5 °C. Alternativamente, las condiciones de almacenamiento pueden ser de 24 horas o 1 semana a 25 °C. Como alternativa, el almacenamiento puede realizarse a temperatura ambiente durante un máximo de dos meses.

En esta solicitud, cuando se hace referencia a valores o rangos de valores específicamente enumerados, el término "aproximadamente", tal como se utiliza en el presente documento, generalmente significa dentro del 20 % del valor o rango dado, preferentemente dentro del 10 %, y más preferentemente dentro del 5 %.

El término "kit" puede comprender tanto la formulación farmacéutica descrita en el presente documento como un dispositivo utilizado para la administración, como por ejemplo el envasado de la formulación farmacéutica junto con un dispositivo para la administración, por ejemplo, una jeringa, un inhalador, una taza medidora, un gotero o un aplicador. La formulación farmacéutica puede envasarse en el recipiente descrito anteriormente. El kit puede incluir opcionalmente instrucciones de uso, que comprenden instrucciones sobre la dosis, el régimen de dosificación y la vía de administración.

El término "tratamiento" comprende los tratamientos terapéuticos, los tratamientos preventivos y las aplicaciones que reducen el riesgo de que los sujetos desarrollen enfermedades u otros factores de riesgo. El tratamiento incluye, entre otros, la curación completa de las enfermedades, así como el alivio de los síntomas o la mitigación de los riesgos subyacentes.

El término "sujeto" en esta solicitud puede usarse indistintamente con "paciente" y se refiere a mamíferos, incluidos, entre otros: humanos y primates no humanos, que comprenden simios y seres humanos; mamíferos equinos (por ejemplo, caballos); mamíferos de granja (por ejemplo, ovejas, cabras, etc.); mascotas mamíferas (perros, gatos, etc.); y roedores (por ejemplo, ratones, ratas, etc.).

El término "cantidad formulada" comprende el contenido de sustancias activas o excipientes en cualquier realización de la presente invención, así como el contenido de sustancias activas o excipientes en todas las formulaciones descritas.

El término "sustancias relacionadas" se refiere a impurezas como materiales de partida, intermedios, subproductos y productos de degradación que pueden introducirse durante la fabricación y el almacenamiento de medicamentos. La presencia de estas impurezas puede afectar la calidad, la seguridad y la eficacia de los productos farmacéuticos. En los estudios de estabilidad de medicamentos, las sustancias relacionadas son un parámetro crítico para la evaluación. El término "proteínas de alto peso molecular (HMWP) o proteína de alto peso molecular" se refiere principalmente a impurezas proteicas con pesos moleculares relativamente altos. Durante la producción y el almacenamiento de productos farmacéuticos, pueden aparecer proteínas de alto peso molecular debido a diversos factores, como la agregación o la deformación. La detección y el análisis de proteínas de alto peso molecular constituyen un paso fundamental para garantizar la calidad y la seguridad de los productos farmacéuticos.

El término "gases inertes", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a gases nobles o gases fisiológicamente inertes. Los gases nobles son elementos del grupo 18 de la tabla periódica, mientras que entre los gases fisiológicamente inertes se incluyen el nitrógeno y el metano.

Descripción detallada

A continuación, se proporcionará una descripción detallada de la realización de la presente invención, con referencia a ejemplos específicos. Sin embargo, los expertos en la técnica comprenderán que los siguientes ejemplos se proporcionan simplemente para ilustrar la invención y no deben interpretarse como una limitación de su alcance. A menos que se especifique lo contrario en los ejemplos, se seguirán las condiciones estándar o las condiciones recomendadas por el fabricante. A menos que se especifique lo contrario, los reactivos o instrumentos utilizados para los que no se especifica el fabricante son todos productos convencionales que pueden adquirirse mediante compra en el mercado.

El ingrediente farmacéutico activo péptido GLP-1 se formuló con varios excipientes utilizando métodos de preparación conocidos en la técnica.

Se evaluaron varias formulaciones preparadas para determinar la estabilidad fisicoquímica general del ingrediente farmacéutico activo péptido GLP-1 en las formulaciones preparadas. La estabilidad de las formulaciones preparadas se analizó utilizando los siguientes métodos:

(1) Determinación de la cantidad de sustancias relacionadas

El contenido de impurezas relacionadas con los derivados de GLP-1 se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El análisis se realizó en una columna Waters Kromasil 100-3,5-C8 (4,6*250 mm) a una temperatura de columna de 35 °C y una temperatura de la celda de muestra de 5 °C, utilizando una velocidad de flujo del eluyente de 1,0 ml/min. La elución se realizó con una fase móvil compuesta por:

La fase A contenía 90 mM de fosfato de dihidrógeno de potasio y 10 % de acetonitrilo (v/v), pH 2,4.

La fase B contenía un 75 % (v/v) de acetonitrilo.

Gradiente: transición lineal del 75 %/25 % A/B al 55 %/45 % A/B de 0 a 5 minutos; transición lineal al 50 %/50 % A/B de 5 a 12 minutos; transición lineal al 40 %/60 % A/B de 12 a 42 minutos; un cambio lineal del 10 %/90 % A/B de 42 a 60 minutos, un cambio lineal de los 60 a los 61 minutos a 75 %/25 % A/B, y un gradiente isométrico de 85 %/15 % A/B entre los 61 y los 70 minutos.

La longitud de onda de detección fue de 214 nm, la velocidad de flujo fue de 1,0 ml/min y el volumen de inyección fue de 15 µl. El aumento de sustancias relacionadas con respecto al día 0 se determinó después del almacenamiento a 4 °C, 25 °C y 37 °C durante varios días.

(2) Determinación de proteínas de alto peso molecular (HMWP)

El contenido de proteínas de alto peso molecular (HMWP) se determinó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) utilizando una columna Waters TSKgel G2000SWXL (7,8x300 mm), 5 µm. La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C, y la temperatura de la celda de muestra se ajustó a 5 °C. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0,5 ml/min. La fase móvil consistió en 300 ml de isopropanol, 400 ml de ácido acético glacial y 300 ml de agua purificada. La longitud de onda de detección fue de 276 nm, con un volumen de muestra de 25 µl. Después de almacenar el producto a 4°C, 25°C y 37°C durante varios días, se midió el aumento de las HMWP en relación con el día 0.

Abreviaturas

Na₂HPO₄ es fosfato de hidrógeno disódico;

El péptido [Gly8, Arg34] GLP-1-(7-37) se preparó utilizando los métodos estándar de expresión de proteínas recombinantes habituales en este campo (véase Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Fourth Edition], (Clonación molecular: manual de laboratorio [cuarta edición]), de Michael R. Green, Cold Spring Harbor Press, 2012, para consultar los protocolos específicos). El péptido [Gly8, Arg34] GLP-1-(7-37) (5 g, 1,48 mmol) se disolvió en una solución acuosa de Na_2HPO_4 100 mM (150 mL), se agregó acetonitrilo (100 mL) y se ajustó el pH a 10–12,5 utilizando NaOH 1 N. Se disolvió eicosanodioato de tert-butiloγGlu (2xOEG-OSu)-OtBu (1,59 g, 1,63 mmol) en acetonitrilo (50 ml) y se agregó lentamente la solución de péptido [Gly8, Arg34] GLP-1-(7-37). El pH se mantuvo entre 10 y 12,5. Después de 120 minutos, la mezcla de reacción se agregó a agua (150 ml) y el pH se ajustó a 5,0 usando una solución acuosa de HCl 1 N. El precipitado se separó por centrifugación y se liofilizó. El producto crudo se agregó a una mezcla de ácido trifluoroacético (60 ml) y diclorometano (60 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se concentró hasta aproximadamente 30 ml, se vertió en n-heptano helado (300 ml) y el producto precipitado se separó por filtración y se lavó dos veces con n-heptano. Después de secar la mezcla al vacío, el producto se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico (Ressource Q, gradiente de acetato de amonio del 0,25 % al 1,25 % en etanol al 42,5 %, pH 7,5) y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (acetonitrilo, agua, TFA). Las fracciones purificadas se agruparon, el pH se ajustó a 5,2 con HCl 1 N y el precipitado se separó y se liofilizó para obtener el compuesto del título.

LC-MS (electrospray): $m/z = 1035,8 [M+4H]^{4+}$

2. Preparación del intermedio tert-butilo docosanedioil- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu

2.1 Tert-butilo docosanedioil-OSu

Bajo protección de nitrógeno, se mezclaron éster mono-tert-butílico del ácido docosanedioico (20 g, 50,17 mmol) y NHS (5,77 g, 50,17 mmol) en diclorometano (400 ml). Se agregaron 13,95 ml de trietilamina y la mezcla turbia resultante se agitó a temperatura ambiente. Se agregó DCC (11,39 g, 55,19 mmol) y la mezcla se agitó durante toda la noche. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta casi quedar seco. El residuo se combinó con agua fría y acetato de etilo, se agitó durante 20 minutos y se separaron las capas. La capa orgánica superior se lavó con salmuera saturada. Una vez separadas las capas, la capa orgánica superior se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida hasta casi quedar seco. La mezcla se secó al vacío durante toda la noche para obtener 24,12 g (rendimiento del 97 %) de tert-butilo docosanedioil -OSu.

2.2 tert-butilo docosanedioil- γ Glu-OtBu

Se disolvieron 24,12 g (48,66 mmol) de tert-butilo docosanedioil-OSu en 250 ml de diclorometano y se agitó. Se agregaron secuencialmente H-Glu-OtBu (10,88 g, 53,53 mmol), trietilamina (12,49 ml) y agua (25 ml). La mezcla se calentó hasta obtener una solución transparente, que se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación, se agregaron 200 ml de solución acuosa de ácido cítrico al 10 % y se separaron las capas. La capa orgánica inferior se lavó con solución salina saturada. Una vez separadas las capas, la capa orgánica inferior se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida hasta casi quedar seco. La mezcla se secó al vacío durante toda la noche para obtener 27,27 g (rendimiento del 96 %) de tert-butilo docosanedioil- γ Glu-OtBu.

2.3 Tert-butilo docosanedioico- γ Glu(OSu)-OtBu

Bajo atmósfera de nitrógeno, se disolvió tert-butilo docosanedioil- γ Glu-OtBu (27,27 g, 46,71 mmol) en diclorometano (300 ml), se agregó trietilamina (11,99 ml) y la mezcla se agitó durante 10 min. A continuación, se agregó NHS (5,38 g, 50,17 mmol) y, posteriormente, DCC (10,60 g, 51,38 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente, se filtró y el filtrado se concentró hasta casi quedar seco. El residuo se mezcló con agua fría y acetato de etilo, se agitó durante 20 minutos y se separaron las capas. La capa orgánica superior se lavó con salmuera saturada. Una vez separadas las capas, la capa orgánica superior se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida hasta casi quedar seco. Se agregó metil tert-butilo éter, se agitó durante 30 minutos, se filtró por succión y el precipitado se secó al vacío durante toda la noche para obtener 25,76 g (rendimiento del 81 %) de tert-butilo docosanedioil- γ Glu(OSu)-OtBu.

2.4 Tert-butilo docosanedioico- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu

Se disolvieron 25,76 g (37,83 mmol) de tert-butilo docosanedioil- γ Glu(OSu)-OtBu en 250 ml de diclorometano y la mezcla se agitó. Se agregaron secuencialmente 2xAEEA (11,66 g, 37,83 mmol), trietilamina (9,71 ml) y agua (25 ml). La mezcla se calentó hasta obtener una solución transparente, que se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación, se agregaron 200 ml de solución acuosa de ácido cítrico al 10 % y se separaron las capas. La capa orgánica inferior se lavó con solución salina saturada. Una vez separadas las capas, la capa orgánica inferior se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida hasta casi quedar seco. La

mezcla se secó al vacío durante toda la noche para obtener 30,75 g (rendimiento del 93 %) de tert-butilo docosanedioil- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu.

2.5 Tert-butilo docosanedioico- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu.

Bajo una atmósfera de nitrógeno, se disolvió tert-butilo docosanedioil- γ Glu-(2xOEG-OH)-OtBu (30,75 g, 35,18 mmol) en diclorometano (300 ml). Se agregaron 9,03 ml de trietilamina y la mezcla se agitó durante 10 minutos; a continuación, se agregaron 4,05 g (35,18 mmol) de NHS. Posteriormente se agregó DCC (7,98 g, 38,70 mmol). La mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente, se filtró y el filtrado se concentró hasta casi quedar seco. El residuo se mezcló con agua fría y acetato de etilo, se agitó durante 20 minutos y se separaron las capas. La capa orgánica superior se lavó con salmuera saturada. Una vez separadas las capas, la capa orgánica superior se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida hasta casi quedar seco. La mezcla se secó al vacío durante toda la noche para obtener 31,09 g (rendimiento del 91 %) de tert-butilo docosanedioil- γ Glu-(2xOEG-OSu)-OtBu.

Preparación del compuesto de título: péptido N - ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-carboxinadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi)acetilo][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) (compuesto 2)

El péptido N - ϵ^{26} -[2-(2-[2-(4-[19-carboxinadecanoilamino]-4(*S*)-carboxibutanoilamino)etoxi]etoxi)acetilo][Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37) se preparó según un procedimiento similar al descrito en la Parte 1 del Ejemplo 1.

LC-MS (electrospray): $m/z = 992,52$ $[M+4H]^{4+}$

El intermedio tert-butilo-docosanedioil- γ Glu-(OEG-OSu)-OtBu se preparó usando pasos similares a los de la Parte 2 del Ejemplo 1.

LC-MS(Sciex100API): $m/z = 826,54(M+1)^+$

Ejemplo 2: Efectos de los antioxidantes ácido cítrico y metionina sobre la estabilidad química de una formulación de péptido GLP-1

2.1 Preparación de formulaciones farmacéuticas

El compuesto 1 se disolvió en una solución de fosfato de hidrógeno disódico hasta alcanzar las concentraciones finales indicadas en la Tabla 1. Cada líquido auxiliar se agregó secuencialmente según las cantidades indicadas en la tabla siguiente, se ajustó el pH a los valores indicados en la tabla y se obtuvo la formulación final que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: Composición de la formulación

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Na ₂ HPO ₄ (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	Fenol (mg/ml)	Propilenglicol (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Metionina (mM)	pH
2-1	10	1,42	—	5,5	14	—	—	7,3
2-2			8,25	—	—	5		
2-3								

2-4						—	5	
2-5	20					—	—	
2-6						5	—	
2-7						—	5	
2-8	40						—	
2-9						5	—	
2-10						—	5	
2-11	60		—	5,5	14			
2-12						—	—	
2-13			8,25	—	—	5		
2-14						—	5	

2.2 Detección de sustancias relacionadas

Las formulaciones 2-1 a 2-14 descritas anteriormente se envasaron en cartuchos prellenados y se sometieron a estudios de estabilidad a 4 °C, 25 °C y 37 °C. Se midió el aumento de sustancias relacionadas con respecto al día 0 para cada formulación (formulaciones 2-1 a 2-14) en diferentes días. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 2, 3 y 4, respectivamente.

Tabla 2: Resultados de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 a 4 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 14	Día 28	Día 63
2-1	10	1,91	2,48	2,48	2,82
2-2		1,86	2,41	2,48	2,67
2-3		1,80	2,40	2,44	2,71
2-4		1,92	2,50	2,43	2,77
2-5	20	1,83	2,41	2,52	2,77
2-6		1,90	2,46	2,52	2,64
2-7		1,81	2,47	2,54	2,78
2-8	40	1,89	2,44	2,59	2,84
2-9		2,01	2,60	2,62	2,84

2-10		1,95	2,55	2,53	2,84
2-11	60	1,53	1,79	1,84	2,09
2-12		1,51	1,72	1,94	2,20
2-13		1,57	1,65	1,90	2,23
2-14		1,52	1,72	1,89	2,23

En la Tabla 2, se puede ver que: las tendencias en los cambios de sustancias relacionadas entre las formulaciones del compuesto 1 que contienen antioxidantes y las formulaciones que contienen conservantes fueron esencialmente consistentes durante el almacenamiento prolongado a 4 °C. El aumento general de sustancias relacionadas para la formulación de alta concentración del compuesto 1 (60 mg/ml) fue menor en comparación con las sustancias relacionadas en el Día 0.

Tabla 3: Resultados de sustancias relacionadas en formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 43	Día 49	Día 56	Día 63	Día 91
2-1	10	1,91	2,07	2,85	2,91	3,09	3,20	3,43	3,27	3,43	3,90	4,21
2-2		1,86	2,20	2,81	2,80	3,18	3,20	3,47	3,56	3,64	4,42	4,75
2-3		1,80	2,48	2,87	2,82	3,02	3,94	3,71	3,39	4,50	3,94	4,21
2-5	20	1,83	2,26	2,79	2,85	3,25	3,19	3,86	3,55	3,92	4,58	5,51
2-6		1,90	2,14	2,74	2,82	3,27	3,21	3,41	3,18	3,55	4,06	4,19
2-7		1,81	2,22	2,79	2,79	3,10	3,23	3,36	3,29	3,60	3,82	4,35
2-8	40	1,89	2,23	2,79	2,90	3,36	3,45	3,73	3,72	3,99	4,53	5,38
2-9		2,01	2,03	2,74	2,82	3,20	3,17	3,42	3,27	3,63	3,99	4,31
2-10		1,95	2,19	2,67	2,95	3,34	3,32	3,45	3,53	3,70	4,36	4,85
2-11	60	1,53	1,76	1,93	2,08	2,38	2,40	2,65	2,60	2,90	3,89	3,67
2-12		1,51	1,56	1,93	2,18	2,49	2,79	3,22	3,00	3,39	4,14	4,58
2-13		1,57	1,70	1,91	2,12	2,46	2,53	2,99	2,84	3,10	3,90	3,66
2-14		1,52	1,78	1,95	2,19	2,40	2,56	2,89	3,03	3,04	3,59	4,00

En la Tabla 3, se puede ver que: la tendencia en los cambios de sustancias relacionadas en condiciones aceleradas a 25 °C fue esencialmente consistente entre las formulaciones del compuesto 1 que contenían antioxidantes y las formulaciones que contenían conservantes. La diferencia en el día 91 fue bastante destacable: en los grupos de concentración del compuesto 1 de 10 mg/ml y 60 mg/ml, la tendencia de las sustancias relacionadas después de la

adición de ácido cítrico fue esencialmente consistente con la de las formulaciones que contenían conservantes. El aumento en las sustancias relacionadas con respecto al día 0 fue mayor en los grupos sin antioxidantes. Cabe destacar que, en los grupos de 20 mg/ml y 40 mg/ml, el aumento de las sustancias relacionadas con respecto al día 0 fue menor en el grupo que contenía ácido cítrico. Además, el aumento de sustancias relacionadas con respecto al día 0 fue menor en el grupo del compuesto 1 de alta concentración (60 mg/ml). La adición de antioxidantes redujo el aumento del contenido de sustancias relacionadas, y el ácido cítrico monohidrato demostró un efecto más pronunciado que la metionina en la mitigación de este aumento, mejorando así la estabilidad de la formulación.

Tabla 4: Resultados de sustancias relacionadas en formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 43	Día 49	Día 56	Día 63
2-1	10	1,91	2,71	3,81	4,29	5,15	5,98	6,57	7,15	7,86	8,90
2-2		1,86	3,01	4,12	5,32	6,96	7,99	8,93	9,76	10,94	12,85
2-3		1,80	2,77	3,88	4,46	5,61	6,01	6,53	6,78	7,68	8,90
2-4		1,92	2,92	3,80	4,49	5,39	6,54	7,04	7,47	8,62	10,13
2-5	20	1,83	2,90	4,29	5,60	7,20	8,16	8,84	9,89	10,31	12,60
2-6		1,90	2,81	3,86	4,35	5,39	5,92	6,49	6,81	7,70	9,02
2-7		1,81	2,92	3,69	4,89	5,94	6,94	7,50	8,69	9,90	10,69
2-8	40	1,89	3,13	4,27	5,45	6,61	7,20	7,82	8,08	9,00	10,00
2-9		2,01	2,99	3,68	4,56	5,59	6,01	6,70	7,02	7,83	9,11
2-10		1,95	3,04	3,84	4,98	6,30	6,99	7,25	8,05	8,88	9,79
2-11	60	1,53	2,53	2,95	3,80	4,64	5,13	5,94	6,43	7,33	8,48
2-12		1,51	2,51	3,33	4,33	5,39	6,28	6,74	7,23	8,71	9,08
2-13		1,57	2,47	3,10	3,78	4,73	5,55	5,86	6,49	7,32	8,42
2-14		1,52	2,51	3,31	3,97	5,18	5,98	6,43	7,11	7,80	8,71

En la Tabla 4, se puede ver que: las formulaciones que contienen antioxidantes y aquellas que contienen conservantes exhibieron tendencias esencialmente consistentes en los cambios de sustancias relacionadas durante el almacenamiento acelerado prolongado a 37 °C. Se observó una diferencia más pronunciada el día 63: en los grupos de concentraciones del compuesto 1 de 10 mg/ml y 60 mg/ml, el aumento de sustancias relacionadas con respecto al día 0 fue mayor en el grupo sin antioxidantes. En los grupos de 20 mg/ml y 40 mg/ml, las formulaciones que contienen ácido cítrico muestran un menor aumento de sustancias relacionadas con respecto al día 0. El aumento de sustancias relacionadas en relación con el día 0 disminuyó con el aumento de la concentración del compuesto 1 en todos los grupos, lo que significa que concentraciones más elevadas del compuesto 1 (por ejemplo, 60 mg/ml) dieron como

resultado sustancias relacionadas más bajas. Además, las formulaciones que contienen NaCl pueden retrasar el aumento de sustancias relacionadas cuando se agregan antioxidantes, en comparación con las formulaciones que contienen propilenglicol, y el ácido cítrico monohidrato muestra un efecto más significativo que la metionina.

En resumen, los antioxidantes, en particular el ácido cítrico monohidrato, pueden retrasar el aumento de sustancias relacionadas en las composiciones de las formulaciones. Entre ellos, el ácido cítrico monohidrato demostró un efecto retardador más pronunciado que la metionina, siendo así más favorable para mejorar la estabilidad de las formulaciones.

2.3 Detección de proteínas de alto peso molecular (HMWP)

Al igual que en la sección 2.2, el aumento de las HMWP en relación con el Día 0 se midió a 4 °C, 25 °C y 37 °C para cada formulación en el ejemplo 2. Los resultados se muestran en las Tablas 5, 6 y 7, respectivamente.

Tabla 5: Resultados de la detección de HMWP para las formulaciones del compuesto 1 a 4°C

Formulación No.	Compuesto (mg/ml)	Día 0	Día 14	Día 28	Día 63
2-1	10	0,17	0,19	0,25	0,26
2-3		0,16	0,19	0,23	0,27
2-5	20	0,15	0,19	0,23	0,24
2-6		0,16	0,19	0,23	0,24
2-7		0,15	0,20	0,23	0,25
2-8	40	0,17	0,19	0,24	0,25
2-9		0,15	0,19	0,23	0,24
2-11	60	0,17	0,17	0,23	0,26
2-12		0,16	0,17	0,23	0,26
2-13		0,15	0,18	0,22	0,25
2-14		0,16	0,20	0,24	0,26

En la Tabla 5, se puede ver que: las formulaciones que contienen antioxidantes y las que contienen conservantes mostraron tendencias prácticamente idénticas en los cambios de las HMWP durante el almacenamiento prolongado a 4 °C.

Tabla 6: Resultados de la detección de HMWP para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 43	Día 49	Día 56	Día 63
2-1	10	0,17	0,22	0,25	0,30	0,40	0,44	0,42	0,55	0,60	0,62
2-2		0,17	0,26	0,24	0,29	0,36	0,40	0,52	0,59	0,66	0,73

2-3		0,16	0,28	0,23	0,25	0,30	0,31	0,33	0,35	0,35	0,38
2-4		0,17	0,26	0,24	0,26	0,30	0,32	0,34	0,36	0,37	0,40
2-5	20	0,15	0,27	0,25	0,33	0,45	0,60	0,76	0,87	0,99	1,25
2-6		0,16	0,25	0,22	0,24	0,28	0,31	0,33	0,33	0,33	0,38
2-7		0,15	0,25	0,23	0,23	0,30	0,33	0,36	0,37	0,39	0,44
2-8	40	0,17	0,24	0,22	0,30	0,48	0,60	0,77	0,86	0,97	1,11
2-9		0,15	0,22	0,22	0,22	0,29	0,31	0,32	0,33	0,33	0,36
2-10		0,17	0,24	0,24	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,48	0,55
2-11	60	0,17	0,20	0,24	0,27	0,35	0,37	0,41	0,48	0,46	0,52
2-12		0,16	0,23	0,26	0,32	0,48	0,58	0,71	0,75	0,88	1,01
2-13		0,15	0,24	0,22	0,22	0,30	0,32	0,33	0,33	0,37	0,42
2-14		0,16	0,22	0,23	0,25	0,34	0,37	0,42	0,46	0,49	0,57

En la Tabla 6, se puede ver que: todos los grupos mostraron un aumento pronunciado en las HMWP durante el almacenamiento acelerado a 25 °C. En las formulaciones que contienen cloruro de sodio, el aumento de las HMWP disminuyó con el aumento de las concentraciones del compuesto 1, excepto en el grupo de 10 mg/ml. Esta diferencia fue particularmente evidente en el día 63: en los grupos de concentración del compuesto 1 de 10 mg/ml y 60 mg/ml, el aumento de las HMWP en relación con el día 0 fue menor cuando se añadió ácido cítrico. En los grupos de 20 mg/ml y 40 mg/ml, el aumento de las HMWP con respecto al día 0 fue notablemente menor en las formulaciones que contenían ácido cítrico. La adición de antioxidantes puede ralentizar el aumento del contenido de las HMWP, y el ácido cítrico monohidrato muestra un efecto más significativo que la metionina.

Tabla 7: Resultados de las HMWP en formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 43	Día 49	Día 56	Día 63
2-1	10	0,17	0,28	0,57	0,76	1,02	1,23	1,46	1,64	1,86	2,16
2-2		0,17	0,33	0,89	1,35	1,89	2,40	3,03	3,43	4,00	4,48
2-3		0,16	0,31	0,31	0,38	0,48	0,54	0,57	0,62	0,67	0,75
2-4		0,17	0,21	0,35	0,50	0,74	0,86	1,29	1,46	1,83	2,19
2-5	20	0,15	0,35	0,97	1,52	2,18	2,65	3,10	3,42	3,81	3,98
2-6		0,16	0,19	0,28	0,35	0,43	0,47	0,53	0,57	0,61	0,68
2-7		0,15	0,22	0,43	0,74	1,25	1,56	1,94	2,15	2,42	2,67

2-8	40	0,17	0,37	1,03	1,38	1,67	1,81	2,03	2,22	2,43	2,48
2-9		0,15	0,20	0,30	0,36	0,43	0,48	0,52	0,57	0,61	0,67
2-10		0,17	0,23	0,54	0,95	1,26	1,43	1,67	1,76	1,91	2,16
2-11	60	0,17	0,23	0,41	0,59	0,78	0,89	1,04	1,18	1,24	1,53
2-12		0,16	0,37	0,86	1,09	1,33	1,43	1,64	1,70	1,96	2,06
2-13		0,15	0,20	0,30	0,38	0,49	0,54	0,59	0,64	0,68	0,75
2-14		0,16	0,28	0,55	0,84	1,10	1,19	1,35	1,39	1,43	1,73

En la Tabla 7, se puede ver que: en las condiciones aceleradas a 37°C, todos los grupos mostraron una tendencia pronunciada de aumento de las HMWP. A medida que aumentaba la concentración de la formulación, disminuían los niveles de las HMWP, observándose una diferencia particularmente marcada en el día 63: en los grupos de concentración del compuesto 1 de 10 mg/ml y 60 mg/ml, el aumento de las HMWP en relación con el día 0 fue menor después de la adición de ácido cítrico. En los grupos de 20 mg/ml y 40 mg/ml, el aumento de las HMWP con respecto al día 0 fue notablemente menor en las formulaciones que contenían ácido cítrico. La adición de antioxidantes puede ralentizar el crecimiento de las HMWP, y el ácido cítrico monohidrato ha demostrado ser más eficaz que la metionina. En resumen, el antioxidante ácido cítrico monohidrato puede ralentizar el aumento del contenido de las HMWP en las composiciones de las formulaciones. Entre ellos, el ácido cítrico monohidrato demostró un efecto retardador más pronunciado que la metionina, siendo así más favorable para mejorar la estabilidad de las formulaciones.

La eliminación del conservante (fenol) y la sustitución del regulador de presión osmótica (propilenglicol → NaCl) dan como resultado un aumento significativo de los niveles de sustancias relacionadas y de las HMWP en las formulaciones. La adición de antioxidantes puede reducir notablemente el aumento de sustancias relacionadas y de las HMWP, el ácido cítrico monohidrato es más eficaz que la metionina. En consecuencia, finalmente se seleccionó el ácido cítrico monohidrato como antioxidante en las formulaciones del compuesto 1.

Ejemplo 3: Determinación de la estabilidad química de las formulaciones

3.1 Preparación de formulaciones

Se comprobó la estabilidad de las formulaciones utilizando cloruro de sodio y propilenglicol como reguladores de la presión osmótica. Las formulaciones se prepararon y envasaron en cartuchos ensamblados. Los diseños de formulación de las formulaciones que contienen el regulador de la presión osmótica se muestran en la Tabla 8:

Tabla 8: Formulaciones del compuesto 1

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Na ₂ HPO ₄ (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	Fenol (mg/ml)	Propilenglicol (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	pH	Reposición de nitrógeno
3-1	30	1,42	—	5,5	14	—	7,3	—

3-2								Reemplazado
3-3								_____
3-4								Reemplazado
3-5								_____
3-6						5		Reemplazado
3-7								_____
3-8								Reemplazado
3-9			8,25					_____
3-10						5		Reemplazado

3.2 Detección de sustancias relacionadas

Las formulaciones 3-1 a 3-10 descritas anteriormente se envasaron en cartuchos precargados y se realizaron los estudios de estabilidad a 4°C, 25°C y 37°C. En el Ejemplo 3, se midió el aumento de sustancias relacionadas en diferentes días en comparación con el día 0 para cada formulación (formulaciones 3-1 a 3-10). Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 9, 10 y 11, respectivamente.

Tabla 9: Resultados de sustancias relacionadas para las formulaciones del compuesto 1 a 4°C

Formulación No.	Día 0	Día 17	Día 28	Día 56
3-1	2,71	2,64	2,58	3,06
3-2	2,76	2,67	2,70	3,08
3-3	2,74	2,70	2,69	3,12
3-4	2,73	2,83	2,65	3,08
3-5	2,78	2,74	2,72	3,15
3-6	2,99	2,88	2,73	3,04
3-7	3,03	2,85	2,76	3,09
3-8	2,86	2,91	2,81	3,09
3-9	2,85	2,99	2,85	3,10
3-10	3,02	2,88	2,86	3,07

En la Tabla 9, se puede ver que: las tendencias en los cambios de sustancias relacionadas fueron esencialmente consistentes en todos los grupos durante el almacenamiento prolongado a 4 °C. Los dos reguladores de presión osmótica diferentes prácticamente no tuvieron efecto sobre la estabilidad (contenido de sustancias relacionadas) de las formulaciones del compuesto 1 durante el almacenamiento prolongado de 56 días a 4 °C.

Tabla 10: Contenido de sustancias relacionadas en formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación No.	Día 0	Día 7	Día 17	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 49	Día 56
3-1	2,71	3,18	3,07	2,91	3,32	3,51	3,51	3,11	4,08
3-2	2,76	3,27	3,18	2,93	3,26	3,55	3,45	3,06	4,14
3-3	2,74	3,54	3,47	3,16	3,27	4,09	4,16	4,07	5,58
3-4	2,73	3,21	3,06	3,09	3,13	3,83	4,01	3,62	4,85
3-5	2,78	3,14	3,00	2,93	2,85	3,50	3,39	3,08	3,91
3-6	2,99	3,66	2,97	2,98	2,74	3,51	3,42	2,83	3,80
3-7	3,03	3,27	3,12	3,16	2,89	3,88	3,82	3,41	4,78
3-8	2,86	3,26	3,11	3,09	2,95	3,80	3,69	3,23	4,45
3-9	2,85	3,40	3,10	3,08	2,87	3,70	3,53	3,07	3,99
3-10	3,02	3,40	3,09	3,03	2,85	3,67	3,57	3,05	4,00

En la Tabla 10, se puede ver que: las tendencias en los cambios de sustancias relacionadas durante el almacenamiento acelerado a 25 °C fueron esencialmente consistentes en todos los grupos. Se puede ver que el cloruro de sodio, cuando se utiliza como regulador de la presión osmótica, da como resultado un crecimiento más lento de las sustancias relacionadas en comparación con el propilenglicol. Además, el desplazamiento del nitrógeno redujo eficazmente la tasa de aumento de las sustancias relacionadas. Las comparaciones entre los grupos 3-5 y 3-3, así como entre los grupos 3-9 y 3-7, revelaron que las tasas de crecimiento de las sustancias relacionadas en ambos grupos se redujeron significativamente después de la adición de ácido cítrico. Sin embargo, el desplazamiento de nitrógeno debido a la presencia de antioxidantes no afectó significativamente la reducción en las tasas de crecimiento de estas sustancias.

Tabla 11: Resultados para sustancias relacionadas en formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37°C

Formulación No.	Día 0	Día 7	Día 17	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 49	Día 56
3-1	2,71	3,35	4,36	4,44	4,82	6,07	6,70	6,99	8,77
3-2	2,76	3,37	4,28	4,45	4,77	6,10	6,55	6,64	8,44
3-3	2,74	3,82	5,86	6,02	6,11	7,33	7,78	8,50	10,40
3-4	2,73	3,69	4,62	4,92	4,52	6,46	7,08	6,96	8,80
3-5	2,78	3,35	4,34	4,54	4,76	5,98	6,13	6,13	7,83
3-6	2,99	3,41	3,92	4,59	4,84	5,96	5,98	6,14	7,73
3-7	3,03	3,82	4,89	6,07	6,54	7,95	8,55	8,78	11,09
3-8	2,86	3,70	4,42	5,00	5,52	6,87	7,11	7,56	9,40

3-9	2,85	3,60	4,04	4,74	5,02	6,19	6,45	6,53	8,17
3-10	3,02	3,50	4,14	4,65	5,07	6,02	6,38	6,64	8,22

En la Tabla 11, se puede ver que: las tendencias en los cambios de sustancias relacionadas durante el almacenamiento acelerado a 37 °C fueron esencialmente consistentes en todos los grupos. Las comparaciones entre los grupos 3-1, 3-3 y 3-7, así como entre los grupos 3-2, 3-4 y 3-8, revelaron que las sustancias relacionadas aumentaron después de la eliminación del fenol. La tasa de aumento es comparable entre las formulaciones que utilizan cloruro de sodio y las que utilizan propilenglicol como regulador de la presión osmótica. El desplazamiento del nitrógeno redujo eficazmente la tasa de aumento de las sustancias relacionadas. Las comparaciones entre los grupos 3-5 y 3-3, así como entre los grupos 3-9 y 3-7, revelaron que las tasas de crecimiento de las sustancias relacionadas en los grupos con diferentes reguladores de la presión osmótica se redujeron después de la adición de ácido cítrico. La comparación entre los grupos 3-5 y 3-6, y entre los grupos 3-9 y 3-10 reveló que: el desplazamiento de nitrógeno debido a la presencia de antioxidantes no redujo significativamente la tasa de aumento de sustancias relacionadas.

3.3 Detección de HMWP

Al igual que en la sección 2.3, el aumento de las HMWP en relación con el Día 0 se midió a 4 °C, 25 °C y 37 °C para cada formulación en el ejemplo 3. Los resultados se muestran en las Tablas 12, 13 y 14, respectivamente.

Tabla 12: Resultados de las HMWP para formulaciones del compuesto 1 después de un almacenamiento prolongado a 4 °C

Formulación No.	Día 0	Día 17	Día 28	Día 56
3-1	0,25	0,26	0,26	0,27
3-2	0,25	0,26	0,25	0,27
3-3	0,25	0,26	0,26	0,27
3-4	0,26	0,27	0,27	0,27
3-5	0,25	0,26	0,26	0,26
3-6	0,26	0,26	0,26	0,26
3-7	0,25	0,25	0,27	0,28
3-8	0,27	0,29	0,28	0,27
3-9	0,26	0,28	0,27	0,26
3-10	0,26	0,29	0,27	0,30

En la Tabla 12, se puede ver que: las tendencias en los cambios de las HMWP durante el almacenamiento prolongado a 4 °C fueron esencialmente consistentes en todos los grupos. Los dos reguladores de la presión osmótica diferentes prácticamente no tuvieron efecto sobre la estabilidad (contenido de HMWP) de las formulaciones del compuesto 1 durante el almacenamiento prolongado de 56 días a 4 °C.

Tabla 13: Contenido de HMWP en formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación No.	Día 0	Día 7	Día 17	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 49	Día 56
3-1	0,25	0,27	0,32	0,29	0,36	0,39	0,46	0,46	0,51
3-2	0,25	0,27	0,31	0,30	0,36	0,35	0,43	0,46	0,47
3-3	0,25	0,28	0,49	0,61	0,87	1,05	1,40	1,61	1,88
3-4	0,26	0,31	0,47	0,50	0,70	0,80	1,02	1,20	1,42
3-5	0,25	0,26	0,28	0,31	0,31	0,30	0,32	0,34	0,36
3-6	0,26	0,26	0,28	0,28	0,33	0,30	0,32	0,33	0,36
3-7	0,25	0,27	0,34	0,36	0,55	0,60	0,79	0,90	1,07
3-8	0,27	0,27	0,36	0,36	0,46	0,52	0,63	0,72	0,81
3-9	0,26	0,26	0,32	0,30	0,30	0,32	0,35	0,33	0,36
3-10	0,26	0,26	0,31	0,30	0,30	0,32	0,37	0,34	0,35

En la Tabla 13, se puede ver que: las tendencias en los cambios de las HMWP durante el almacenamiento acelerado a 25°C fueron esencialmente consistentes en todos los grupos. Las comparaciones entre los grupos 1, 3 y 7, así como entre los grupos 2, 4 y 8, revelaron que la eliminación del fenol dio como resultado un aumento de las HMWP. Entre estos, el grupo que utilizó el regulador osmótico de cloruro de sodio mostró un crecimiento más lento de las HMWP en comparación con el grupo que utilizó el regulador osmótico de propilenglicol. El desplazamiento del nitrógeno redujo la tasa de aumento de las HMWP. Las comparaciones entre los grupos 5 y 9 revelaron que la tasa de aumento de las HMWP en ambos grupos con diferentes reguladores de presión osmótica se ralentizó después de la adición de ácido cítrico. Sin embargo, el desplazamiento de nitrógeno en función de la presencia de antioxidantes no redujo significativamente el aumento de las HMWP.

Tabla 14: Resultados de las HMWP en formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulación No.	Día 0	Día 7	Día 17	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 49	Día 56
3-1	0,25	0,36	0,61	0,68	0,84	0,99	1,26	1,36	1,60
3-2	0,25	0,34	0,53	0,60	0,70	0,81	0,99	1,13	1,28
3-3	0,25	0,87	1,91	2,01	2,25	2,41	2,69	2,86	3,13
3-4	0,26	0,70	1,03	1,19	1,37	1,47	1,76	1,86	2,18
3-5	0,25	0,32	0,38	0,41	0,45	0,46	0,59	0,60	0,65
3-6	0,26	0,30	0,37	0,39	0,43	0,46	0,51	0,54	0,55
3-7	0,25	0,55	1,42	1,71	2,16	2,45	2,82	2,99	3,30
3-8	0,27	0,47	1,14	1,11	1,36	1,46	1,78	1,92	2,21

3-9	0,26	0,34	0,43	0,38	0,45	0,49	0,59	0,61	0,63
3-10	0,26	0,36	0,41	0,39	0,43	0,45	0,52	0,51	0,56

4.2 Detección de sustancias relacionadas

Las formulaciones 4-1 a 4-6 descritas anteriormente se envasaron en sus dispositivos correspondientes y se sometieron a estudios de estabilidad a 4 °C, 25 °C y 37 °C. El aumento de las sustancias relacionadas con respecto al día 0 para cada formulación que figura en la Tabla 15 se midió en diferentes momentos. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 16, 17 y 18, respectivamente.

Tabla 16: Resultados de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 con almacenamiento prolongado a 4 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 14	Día 28
4-1	2	1,85	1,98	1,99
4-2	48	1,80	1,93	1,91
4-3	2	1,82	1,96	2,05
4-4	2	1,82	2,02	2,02
4-5	48	1,83	1,92	2,04
4-6	48	1,83	1,92	1,97

En la Tabla 16, se puede ver que: las tendencias de cambio en las sustancias relacionadas para cada grupo fueron sustancialmente consistentes durante el almacenamiento prolongado a 4 °C. No hubo diferencias significativas en las sustancias relacionadas entre los grupos, y los diferentes dispositivos no tuvieron efectos significativos en la estabilidad de las formulaciones del compuesto 1.

Tabla 17: Comparación de los resultados de sustancias relacionadas para las formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación N.º	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
4-2	48	1,80	2,06	2,24	2,55	2,40
4-5	48	1,83	1,98	2,14	2,34	2,44
4-6	48	1,83	1,96	2,11	2,45	2,45

En la Tabla 17, se puede ver que, los diferentes dispositivos no tuvieron efectos significativos sobre la estabilidad de las formulaciones del Compuesto 1.

Tabla 18: Resultados de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulación N.º	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
4-2	48	1,80	2,47	3,15	3,86	4,55
4-3	2	1,82	2,63	3,19	3,95	4,55

4-6	48	1,83	2,47	3,17	3,81	4,63
-----	----	------	------	------	------	------

En la Tabla 18, se puede ver que, los diferentes dispositivos no tuvieron efectos significativos sobre la estabilidad de las formulaciones del Compuesto 1.

4.3 Detección de HMWP

De forma similar a la Sección 4.2, el aumento de las HMWP en relación con el día 0 se midió a 4 °C, 25 °C y 37 °C para cada formulación en la Tabla 18. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 19, 20 y 21, respectivamente.

Tabla 19: Contenido de las HMWP de las formulaciones del compuesto 1 en condiciones prolongadas a 4 °C en un experimento comparativo

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 14	Día 28
4-1	2	0,26	0,25	0,28
4-2	48	0,25	0,23	0,27
4-3	2	0,24	0,23	0,27
4-4	2	0,24	0,23	0,23
4-5	48	0,26	0,27	0,22
4-6	48	0,26	0,23	0,26

En la Tabla 19, se puede ver que: los diferentes dispositivos no tuvieron un efecto significativo en la estabilidad (contenido de HMWP) de las formulaciones del Compuesto 1 durante el almacenamiento prolongado de 28 días a 4 °C.

Tabla 20: Cambios de las HMWP en formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
4-3	2	0,24	0,28	0,27	0,29	0,35
4-4	2	0,24	0,30	0,30	0,38	0,29
4-5	48	0,26	0,29	0,29	0,34	0,28
4-6	48	0,26	0,29	0,26	0,29	0,33

En la Tabla 20, se puede ver que: los diferentes dispositivos no tuvieron efectos significativos sobre la estabilidad de las formulaciones del compuesto 1.

Tabla 21: Resultados de las HMWP en condiciones aceleradas a 37 °C para dispositivos de solución de inyección del compuesto 1 en un experimento de comparación

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
-----------------	---------------------	-------	-------	--------	--------	--------

4-4	2	0,24	0,41	0,35	0,57	0,49
4-5	48	0,26	0,33	0,37	0,47	0,39
4-6	48	0,26	0,33	0,35	0,43	0,48

En la Tabla 21, se puede ver que: al comparar los grupos 4-3 con el 4-4, así como los grupos 4-5 con el 4-6, las tendencias de cambio en las HMWP para cada grupo fueron esencialmente consistentes durante el almacenamiento acelerado a 37 °C: no hubo diferencias significativas en las HMWP entre los cartuchos precargados y las jeringas precargadas. Los cambios en las sustancias relacionadas de los grupos 4-3 y 4-4 fueron ligeramente superiores a los del grupo 4-1. Al comparar los grupos 4-5 y 4-6 con el grupo 4-2, no se observaron diferencias significativas.

Ejemplo 5: Efecto de la concentración del péptido GLP-1 en la estabilidad de la formulación

5.1 Preparación de formulaciones

Las concentraciones del compuesto 1 en las formulaciones se dividieron en cuatro niveles de concentración (6 mg/ml, 12 mg/ml, 24 mg/ml y 48 mg/ml), con una concentración de cloruro de sodio de 6 mg/ml. Se realizaron estudios de estabilidad en formulaciones del compuesto 1 en estos cuatro niveles de concentración. No se realizó la reposición de nitrógeno en ninguno de los grupos experimentales. El diseño experimental para la confirmación de la concentración de la formulación se muestra en la Tabla 22 a continuación:

Tabla 22: Formulaciones del compuesto 1

Formulaciones	Compuesto 1 (mg/ml)	Na ₂ HPO ₄ (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	Fenol (mg/ml)	Propilenglicol (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato	pH
5-1	5	1,42	—	5,5	14	—	7,3
5-2	30			—			
5-3	6		6	—	—	5mM	
5-4	12						
5-5	24						
5-6	48						

5.2 Detección de sustancias relacionadas

Las formulaciones mencionadas anteriormente 5-1 a 5-6 se envasaron en sus dispositivos correspondientes y se sometieron a estudios de estabilidad a 4 °C, 25 °C y 37 °C. El aumento de sustancias relacionadas a lo largo de diferentes días en relación con el día 0 se midió para cada formulación indicada en la Tabla 22, como se muestra en las Tablas 23, 24 y 25 respectivamente.

Tabla 23: Resultados de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 con almacenamiento prolongado a 4 °C

Formulaciones	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 14	Día 28
---------------	---------------------	-------	--------	--------

5-1	5	1,95	2,05	1,90
5-2	30	1,95	2,15	1,80
5-3	6	2,01	2,13	1,87
5-4	12	1,94	2,07	1,78
5-5	24	2,06	2,27	2,03
5-6	48	2,16	2,11	2,16

En la Tabla 23, se puede ver que: las tendencias en los cambios de sustancias relacionadas para cada grupo fueron esencialmente consistentes durante el almacenamiento prolongado a 4 °C. Las diferentes formulaciones no tuvieron un efecto significativo en la estabilidad (contenido de sustancias relacionadas) de las formulaciones del compuesto 1 durante el almacenamiento prolongado de 28 días a 4 °C.

Tabla 24: Resultados de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulaciones	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
5-3	6	2,01	2,02	2,24	2,09	2,51
5-4	12	1,94	2,07	2,23	2,14	2,49
5-5	24	2,06	2,05	2,23	2,12	2,45
5-6	48	2,16	2,15	2,27	2,21	2,52

En la Tabla 24, se puede ver que: las tendencias en los cambios de sustancias relacionadas entre los grupos fueron esencialmente consistentes durante el almacenamiento acelerado a 25 °C. No se observaron diferencias significativas en las sustancias relacionadas entre los grupos 5-3 a 5-6.

Tabla 25: Resultados de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulaciones	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
5-1	5	1,95	2,42	3,28	3,83	4,67
5-3	6	2,01	2,48	3,20	3,69	4,87
5-4	12	1,94	2,44	3,24	3,59	4,65
5-5	24	2,06	2,61	3,25	3,60	4,58
5-6	48	2,16	2,52	3,30	3,82	4,73

En la Tabla 25, se puede ver que: las sustancias relacionadas en cada grupo mostraron una tendencia creciente durante el almacenamiento acelerado a 37 °C. No se observaron diferencias significativas en las sustancias relacionadas entre los grupos.

5.3 Detección de HMWP

De forma similar a la Sección 5.2, el aumento de las HMWP en relación con el día 0 se midió a 4 °C, 25 °C y 37 °C para cada formulación en la Tabla 22. Los resultados de la detección se muestran en las Tablas 26, 27 y 28, respectivamente.

Tabla 26: Resultado de las HMWP para las formulaciones del compuesto 1 a 4 °C

Formulaciones	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 14	Día 28
5-1	5	0,22	0,26	0,26
5-2	30	0,22	0,26	0,26
5-3	6	0,22	0,27	0,26
5-4	12	0,23	0,26	0,27
5-5	24	0,22	0,25	0,25
5-6	48	0,23	0,26	0,25

En la Tabla 26, se puede ver que: las tendencias en los cambios en las HMWP para cada grupo fueron esencialmente consistentes durante el almacenamiento prolongado a 4 °C. Las diferentes formulaciones no tuvieron un efecto significativo en la estabilidad (contenido de HMWP) de las formulaciones del compuesto 1 durante almacenamiento prolongado de 28 días a 4 °C.

Tabla 27: Resultados de las HMWP para los experimentos de confirmación de la concentración de la formulación del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulaciones	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
5-1	5	0,22	0,29	0,33	0,42	0,37
5-3	6	0,22	0,28	0,33	0,34	0,32
5-4	12	0,23	0,28	0,31	0,32	0,31
5-5	24	0,22	0,27	0,30	0,32	0,31
5-6	48	0,23	0,26	0,30	0,32	0,30

En la Tabla 27, se puede ver que: las HMWP de cada grupo mostraron una tendencia creciente durante el almacenamiento acelerado a 25 °C, sin observarse diferencias significativas entre ellas.

Tabla 28: Resultados de las HMWP para el experimento de confirmación de la concentración de la formulación del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulaciones	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
5-3	6	0,22	0,38	0,46	0,57	0,55

5-4	12	0,23	0,32	0,42	0,48	0,51
5-5	24	0,22	0,33	0,42	0,49	0,47
5-6	48	0,23	0,32	0,40	0,46	0,49

En la Tabla 28, se puede ver que: las sustancias relacionadas de cada grupo mostraron una tendencia creciente durante el almacenamiento acelerado a 37 °C, sin observarse diferencias significativas entre ellas.

Ejemplo 6: Efecto de la concentración del regulador de la presión osmótica en la formulación

En las formulaciones del compuesto 1, se utilizó el regulador de la presión osmótica, cloruro de sodio, principalmente para regular la presión osmótica dentro de las formulaciones. Las diferentes concentraciones del compuesto 1 (con todos los demás excipientes en concentraciones idénticas) dieron como resultado diferentes presiones osmóticas. La presión osmótica en la concentración máxima de formulación de 48 mg/ml se aproxima al límite superior de la presión osmótica humana normal (280–310 mOsmol/kg), específicamente 310 mOsmol/kg. La presión osmótica a la concentración mínima de la formulación de 6 mg/ml se aproxima al límite inferior de la presión osmótica humana normal (280 mOsmol/kg). En los experimentos no se realizó desplazamiento ni empaquetamiento de nitrógeno. El diseño y los resultados de la concentración del regulador de la presión osmótica se muestran en la Tabla 29:

Tabla 29: Formulaciones del compuesto 1 y resultados de la presión osmótica

Formulación No.	NaCl (mg/ml)	Compuesto 1 (mg/ml)	Na ₂ HPO ₄ (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mg/ml)	pH	Presión osmótica (mOsmol/kg)
6-1	6	0	1,42	1,05 (5mM)	7,3	235
6-2		6				239
6-3		12				253
6-4		24				260
6-5		48				285
6-6	7	0	1,42	1,05 (5mM)	7,3	268
6-7		6				273
6-8		12				283
6-9		24				294
6-10		48				320

Como se muestra en la tabla anterior, los resultados de la presión osmótica indicaron que, a una concentración de cloruro de sodio de 7 mg/ml, la presión osmótica de la concentración mínima de la formulación de 6 mg/ml es de 273 mOsmol/kg, aproximándose a la presión osmótica humana normal mínima de 280 mOsmol/kg. La presión

osmótica de las formulaciones a la concentración máxima de 48 mg/ml es de 320 mOsmol/kg, aproximándose al límite superior de la osmolaridad humana normal de 310 mOsmol/kg.

Ejemplo 7: Efecto de la concentración de ácido cítrico en la estabilidad de la formulación

El ácido cítrico en las formulaciones puede causar dolor en el sitio de la inyección. La reducción de la concentración de ácido cítrico puede aliviar el dolor inducido por el ácido cítrico (Ya Lan Yang¹ and Ted Weita Lai^{1,2,3}. Citric Acid in Drug Formulations Causes Pain by Potentiating Acid-Sensing Ion Channel 1 (El ácido cítrico presente en las formulaciones farmacológicas provoca dolor al potenciar el canal iónico sensible al ácido 1) [J]. The Journal of Neuroscience, May 26, 2021•41(21):4596–4606). Por lo tanto, es necesario identificar una concentración óptima de ácido cítrico que minimice el dolor al mismo tiempo que mantiene una buena estabilidad.

7.1 Estudio sobre el efecto de la concentración de ácido cítrico (0,005 mM–10 mM) en la estabilidad de la formulación

Se estudió el efecto de concentraciones de ácido cítrico que varían entre 0,005 mM y 10 mM sobre la estabilidad de la formulación. Se seleccionó una formulación de 2 mg/ml del compuesto 1 (con los demás componentes idénticos a la Formulación 5-1) para realizar pruebas de estabilidad en condiciones aceleradas a 37 °C.

Tabla 30: Efecto del ácido cítrico 0,005 mM–0,1 mM sobre la estabilidad (contenido de HMWP)

Formulación No.	Formulaciones	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 36	Día 42	Día 49	Día 56	Día 65	Día 70
7-1	Ácido cítrico 0 mM	0,3	0,61	0,97	1,25	1,58	2,09	2,12	2,76	2,66	3,12	3,36
7-2	Ácido cítrico 0,1 mM	0,32	0,53	1,07	0,93	1,14	1,47	1,54	1,76	1,87	2,11	2,25
7-3	Ácido cítrico 0,05 mM	0,29	0,53	0,84	1,02	1,21	1,62	1,84	1,96	2,21	2,51	2,64
7-3	0,01 mM Ácido cítrico	0,29	0,59	0,89	1,14	1,35	2,23	1,96	2,4	2,5	2,79	2,98
7-4	0,005 mM Ácido cítrico	0,31	0,6	0,9	1,21	1,42	2,32	2,16	2,41	2,54	3,17	3,19

Tabla 31: Efecto del ácido cítrico de 0,1 mM a 1 mM sobre la estabilidad (contenido de HMWP)

Formulaciones	Día 0	Día 7	Día 14
Ácido cítrico 0 mM	0,31	1,29	2,09
Ácido cítrico 0,1 mM	0,34	1,01	1,63
Ácido cítrico 0,2 mM	0,34	0,94	1,51

Ácido cítrico 0,5 mM	0,33	0,74	1,31
Ácido cítrico 1 mM	0,34	0,73	1,24

Tabla 32: Efecto del ácido cítrico 1 mM–10 mM sobre la estabilidad (contenido de HMWP)

Formulaciones	Día 0	Día 7	Día 14	Día 18	Día 35	Día 41	Día 49	Día 55	Día 63	Día 69
Ácido cítrico 0 mM	0,25	1,16	2,02	2,45	3,68	4,36	4,48	4,79	5,25	5,82
Ácido cítrico 1 mM	0,27	0,62	1,15	1,4	2,11	2,59	2,64	2,78	3,06	3,57
Ácido cítrico 2 mM	0,28	0,62	1,15	1,37	2,06	2,65	2,55	2,9	3,02	3,47
Ácido cítrico 5 mM	0,29	0,8	1,23	1,43	2,07	2,73	2,6	2,8	3,06	3,46
Ácido cítrico 10 mM	0,26	0,8	1,18	1,46	2,04	2,71	2,5	2,77	2,97	3,44

Tabla 33: Efecto del ácido cítrico de 1 mM a 10 mM sobre la estabilidad (contenido de sustancias relacionadas)

Formulaciones	Día 0	Día 7	Día 14	Día 18	Día 35	Día 41	Día 49	Día 55	Día 63	Día 69
Ácido cítrico 0 mM	97,42	93,49	92,19	91,68	87,83	88,09	87,20	87,06	84,44	84,28
Ácido cítrico 1 mM	97,64	93,97	92,93	92,44	90,23	89,74	88,64	88,78	87,85	86,36
Ácido cítrico 2 mM	97,59	93,69	92,75	92,43	90,35	89,70	88,80	88,90	87,87	86,45
Ácido cítrico 5 mM	97,57	93,58	92,48	92,34	90,09	89,55	88,63	88,75	87,75	86,33
Ácido cítrico 10 mM	97,63	93,48	92,49	92,09	90,19	89,05	88,33	88,49	87,73	86,48

Los tres experimentos anteriores demuestran que, en concentraciones de ácido cítrico que van desde 0,005 mM hasta 1 mM, la tendencia de crecimiento de las HMWP disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido cítrico; no hay ningún efecto sobre los cambios en las sustancias relacionadas. En concentraciones de ácido cítrico que oscilan entre 1 mM y 10 mM, la adición de ácido cítrico reduce las tendencias de crecimiento de las sustancias relacionadas y de las HMWP, pero esta reducción no cambia al aumentar la concentración de ácido cítrico.

7.2 Estudio sobre el efecto del ácido cítrico en la estabilidad de la formulación

Excipientes de la formulación	Formulaciones del compuesto 1				
	7.2-1	7.2-2	7.2-3	7.2-4	7.2-5
Fenol	5,5 mg/ml	—	—	—	—
Propilenglicol	14 mg/ml	14 mg/ml	14 mg/ml	—	—
Cloruro de sodio	—	—	—	7 mg/ml	7 mg/ml
Ácido cítrico monohidrato	—	—	5mM	—	5mM
Fosfato de hidrógeno disódico	1,42 mg/ml				

Se evaluó la estabilidad de las formulaciones que contienen el compuesto 1 a una concentración de 2 mg/ml en condiciones aceleradas a 37 °C. Se realizaron estudios de estabilidad acelerada (contenido de HMWP) para cada formulación a 37 °C, cuyos resultados se muestran en las Tablas 34 y 35.

Tabla 34: Efecto del ácido cítrico 5 mM en la estabilidad de la formulación (contenido de HMWP)

Formulación No.	Día 0	Día 7	Día 17	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 49	Día 56
7.2-1	0,25	0,36	0,61	0,68	0,84	0,99	1,26	1,36	1,60
7.2-2	0,25	0,87	1,91	2,01	2,25	2,41	2,69	2,86	3,13
7.2-3	0,25	0,32	0,38	0,41	0,45	0,46	0,59	0,60	0,65
7.2-4	0,25	0,55	1,42	1,71	2,16	2,45	2,82	2,99	3,30
7.2-5	0,26	0,34	0,43	0,38	0,45	0,49	0,59	0,61	0,63

Tabla 35: Efecto del ácido cítrico 5 mM sobre la estabilidad (contenido de sustancias relacionadas) de cada formulación

Formulaciones	Día 0	Día 7	Día 17	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 49	Día 56
7.2-1	0,25	0,36	0,61	0,68	0,84	0,99	1,26	1,36	1,60
7.2-2	0,25	0,87	1,91	2,01	2,25	2,41	2,69	2,86	3,13
7.2-3	0,25	0,32	0,38	0,41	0,45	0,46	0,59	0,60	0,65
7.2-4	0,25	0,55	1,42	1,71	2,16	2,45	2,82	2,99	3,30
7.2-5	0,26	0,34	0,43	0,38	0,45	0,49	0,59	0,61	0,63

En las Tablas 34 y 35 anteriores, se puede ver que: las concentraciones de ácido cítrico que varían de 1 mM a 10 mM contribuyen a mejorar la estabilidad de las formulaciones del compuesto 1, sin que se observen diferencias significativas en sus efectos estabilizadores en este rango de concentración.

7.3 Efecto de la concentración de ácido cítrico sobre la estabilidad de las formulaciones del compuesto 1 a diferentes concentraciones

7.3.1 Preparación de formulaciones

Se seleccionaron formulaciones del compuesto 1 en concentraciones bajas (3 mg/ml) y altas (48 mg/ml) para estudios de concentración de ácido cítrico. Las formulaciones 1 a 10 se prepararon tal como se muestra en la Tabla 36 siguiente.

Tabla 36: Formulaciones del compuesto 1

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Na ₂ HPO ₄ (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	pH
7.3-1	3	0	1,42	7	7,3
7.3-2		0,5			

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Na ₂ HPO ₄ (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	pH
7.3-3	48	1			
7.3-4		2			
7.3-5		5			
7.3-6		0			
7.3-7		0,5			
7.3-8		1			
7.3-9		2			
7.3-10		5			

7.3.2 Detección de sustancias relacionadas

Las formulaciones 7.3-1 a 7.3-10 descritas anteriormente se envasaron en cartuchos prellenados y se sometieron a estudios de estabilidad a 4 °C, 25 °C y 37 °C. El aumento de las sustancias relacionadas con respecto al día 0 se midió para cada formulación (formulaciones 7.3-1 a 7.3-10) en diferentes días. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 37, 38 y 39.

Tabla 37: Resultados de la detección de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 en condiciones de almacenamiento prolongado a 4 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Día 0	Día 29	Día 55
7.3-1	3	0	2,27	2,23	2,33
7.3-2		0,5	2,21	2,27	2,32
7.3-3		1	2,22	2,27	2,17
7.3-4		2	2,26	2,25	2,23
7.3-5		5	2,22	2,26	2,25
7.3-6	48	0	2,18	2,20	2,22
7.3-7		0,5	2,18	2,20	2,29
7.3-8		1	2,15	2,27	2,30
7.3-9		2	2,21	2,19	2,25
7.3-10		5	2,17	2,25	2,20

En la Tabla 37, se puede ver que: las tendencias en los cambios de sustancias relacionadas para cada grupo fueron

esencialmente consistentes durante el almacenamiento prolongado a 4 °C. Después de 55 días de almacenamiento prolongado a 4 °C, las diferentes concentraciones de ácido cítrico monohidrato no tuvieron un efecto significativo en la tendencia de la estabilidad (cambios en el contenido de sustancias relacionadas) de la formulación del Compuesto 1.

Tabla 38: Resultados de la detección de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Día 0	Día 29	Día 55
7.3-1	3	0	2,27	2,95	3,29
7.3-2		0,5	2,21	2,83	3,11
7.3-3		1	2,22	2,58	2,88
7.3-4		2	2,26	2,85	2,99
7.3-5		5	2,22	2,76	3,05
7.3-6	48	0	2,18	3,25	4,19
7.3-7		0,5	2,18	3,15	3,86
7.3-8		1	2,15	2,92	3,50
7.3-9		2	2,21	2,84	3,25
7.3-10		5	2,17	3,05	3,14

En la tabla 38, se puede ver que: en formulaciones que contienen 48 mg/ml del compuesto 1, la tasa de crecimiento de sustancias relacionadas disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido cítrico monohidrato. En formulaciones que contienen 3 mg/ml del compuesto 1, las concentraciones de ácido cítrico monohidrato que varían de 0,5 mM a 5 mM contribuyen a disminuir el crecimiento de sustancias relacionadas en comparación con las formulaciones sin ácido cítrico monohidrato. Sin embargo, el efecto a 0,5 mM de ácido cítrico monohidrato es más débil que el que se observa entre 1 mM y 5 mM.

Tabla 39: Resultados de la detección de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 22	Día 29	Día 55
7.3-1	3	0	2,27	3,10	4,42	5,34	7,27	13,54
7.3-2		0,5	2,21	2,92	3,72	3,92	5,07	7,56
7.3-3		1	2,22	2,91	3,57	3,77	5,01	7,40
7.3-4		2	2,26	2,89	3,67	4,01	4,83	7,32

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Día 0	Día 7	Día 14	Día 22	Día 29	Día 55
7.3-5		5	2,22	2,86	3,65	3,98	5,17	7,33
7.3-6	48	0	2,18	3,10	4,58	4,91	6,22	8,81
7.3-7		0,5	2,18	2,92	4,28	4,83	5,85	8,60
7.3-8		1	2,15	2,81	4,03	4,59	6,33	8,38
7.3-9		2	2,21	2,79	3,87	4,34	5,47	8,15
7.3-10		5	2,17	2,82	3,79	4,08	5,26	7,40

En la tabla 39 se puede ver que: en formulaciones que contienen 3 mg/ml del compuesto 1, la estabilidad de las sustancias relacionadas en formulaciones con ácido cítrico monohidrato es significativamente superior a aquellas sin ácido cítrico. Las formulaciones con 2–5 mM de ácido cítrico monohidrato muestran tendencias de crecimiento similares en sustancias relacionadas, todas muestran una mayor estabilidad que las formulaciones con 0,5 mM de ácido cítrico monohidrato; en formulaciones que contienen 48 mg/ml del compuesto 1, la tasa de crecimiento de las sustancias relacionadas disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido cítrico monohidrato.

7.3.3 Detección de HMWP

De forma similar a la Sección 7.3.2, el aumento de las HMWP en relación con el día 0 se midió a 4 °C, 25 °C y 37 °C para las formulaciones del Ejemplo 7.3.1. Los resultados de la detección se muestran en las Tablas 40, 41 y 42, respectivamente.

Tabla 40: Resultados de la detección del contenido de HMWP para formulaciones del compuesto 1 en condiciones de almacenamiento prolongado a 4 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Día 0	Día 29	Día 55
7.3-1	3	0	0,29	0,32	0,29
7.3-2		0,5	0,32	0,36	0,31
7.3-3		1	0,31	0,32	0,34
7.3-4		2	0,33	0,35	0,31
7.3-5		5	0,32	0,33	0,31
7.3-6	48	0	0,34	0,32	0,30
7.3-7		0,5	0,32	0,31	0,34
7.3-8		1	0,33	0,31	0,31
7.3-9		2	0,31	0,31	0,30

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Día 0	Día 29	Día 55
7.3-10		5	0,31	0,30	0,32

En la Tabla 40, se puede ver que: las tendencias en los cambios en las HMWP para cada formulación fueron esencialmente consistentes durante el almacenamiento prolongado a 4 °C. Diferentes concentraciones de ácido cítrico monohidrato no tuvieron un efecto significativo en la tasa de crecimiento de las HMWP en las formulaciones del compuesto 1 durante los 55 días de almacenamiento prolongado a 4 °C.

Tabla 41: Resultados de la detección de HMWP para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato (mM)	Día 0	Día 29	Día 55
7.3-1	3	0	0,29	0,43	0,69
7.3-2		0,5	0,32	0,42	0,44
7.3-3		1	0,31	0,43	0,45
7.3-4		2	0,33	0,40	0,46
7.3-5		5	0,32	0,41	0,45
7.3-6	48	0	0,34	0,83	1,41
7.3-7		0,5	0,32	0,56	1,06
7.3-8		1	0,33	0,45	0,74
7.3-9		2	0,31	0,42	0,52
7.3-10		5	0,31	0,39	0,45

En la Tabla 41, se puede ver que: en las formulaciones que contienen 3 mg/ml del compuesto 1 con diferentes concentraciones (0,5 mM a 5 mM) de ácido cítrico monohidrato, las tasas de crecimiento de las HMWP fueron esencialmente consistentes y todas superiores a la de la formulación 7.3-1 sin ácido cítrico monohidrato. En formulaciones que contienen 48 mg/ml del compuesto 1, la tasa de crecimiento de las HMWP disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido cítrico monohidrato.

Tabla 42: Resultados de la detección de HMWP para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato mM	Día 0	Día 7	Día 14	Día 22	Día 29	Día 55
7.3-1	3	0	0,29	0,6	1,18	1,82	2,57	5,15
7.3-2		0,5	0,32	0,40	0,50	0,58	0,71	1,12
7.3-3		1	0,31	0,39	0,48	0,57	0,68	0,82

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato mM	Día 0	Día 7	Día 14	Día 22	Día 29	Día 55
7.3-4	48	2	0,33	0,37	0,43	0,49	0,62	0,79
7.3-5		5	0,32	0,37	0,45	0,49	0,59	0,75
7.3-6		0	0,34	0,9	1,64	1,62	1,59	2,24
7.3-7		0,5	0,32	0,59	1,16	1,36	1,43	2,01
7.3-8		1	0,33	0,53	0,87	1,17	1,28	1,76
7.3-9		2	0,31	0,47	0,73	0,93	1,04	1,62
7.3-10		5	0,31	0,41	0,53	0,56	0,60	1,03

En la tabla 42, se puede ver que: durante 55 días de almacenamiento acelerado a 37 °C, en las formulaciones que contienen 3 mg/ml del compuesto 1 con diferentes concentraciones (de 1 a 5 mM) de ácido cítrico monohidrato, las tasas de crecimiento de las HMWP son esencialmente consistentes y todas superiores a las de la formulación 7.3-2 (que contiene 0,5 mM de ácido cítrico monohidrato). La formulación 7.3-2, que contiene 0,5 mM de ácido cítrico monohidrato, muestra una tasa de crecimiento de las HMWP significativamente más lenta que la de la formulación 7.3-1 sin ácido cítrico monohidrato. En las formulaciones que contienen 48 mg/ml del compuesto 1, la tasa de crecimiento de las HMWP disminuye al aumentar la concentración de ácido cítrico monohidrato.

Ejemplo 8: Estudio de estabilidad de las formulaciones del compuesto 1

8.1 Preparación y llenado de formulaciones

Las formulaciones 8-1 a 8-9 del compuesto 1 se prepararon y envasaron de acuerdo con la Tabla 43.

Tabla 43: Formulaciones del compuesto 1

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	NaCl (mg/ml)	Propilenglicol (mg/ml)	Ácido cítrico monohidrato mM	Fenol (mg/ml)	Na ₂ HPO ₄ (mg/ml)	pH	Dispositivos
8-1	3	—	14	—	—	1,42	7,3	Jeringa precargada
8-2	48							Jeringa precargada
8-3	3	7	—	2				Jeringa precargada
8-4	48							Jeringa precargada

8.2 Detección de sustancias relacionadas

Después de que las formulaciones mencionadas anteriormente, 8-1 a 8-4 se envasaron en sus dispositivos correspondientes; se realizaron estudios de estabilidad a 4 °C, 25 °C y 37 °C. En el Ejemplo 8.1 se midió el aumento de sustancias relacionadas a lo largo de diferentes días en relación con el día 0 para cada formulación (formulaciones 8-1 a 8-4). Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 44, 45 y 46, respectivamente.

Tabla 44: Resultados de la detección de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 en condiciones de almacenamiento prolongado a 4 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 27	Día 53
8-1	3	2,29	2,53	2,55
8-2	48	2,19	3,08	2,49
8-3	3	2,25	3,06	2,55
8-4	48	2,19	2,64	2,49

En la Tabla 44, se puede ver que: las tendencias en los cambios de sustancias relacionadas para cada formulación fueron esencialmente consistentes durante el almacenamiento prolongado a 4 °C. No se observaron diferencias significativas en la estabilidad de las distintas formulaciones del compuesto 1 durante el período de almacenamiento de 53 días a 4 °C.

Tabla 45: Resultados de la detección de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 27	Día 53
8-1	3	2,29	8,85	9,27
8-2	48	2,19	3,95	4,94
8-3	3	2,25	3,42	3,54
8-4	48	2,19	2,88	3,55

En la Tabla 45, se puede ver que: la estabilidad de las formulaciones 8-3 y 8-4 es significativamente superior a la de las formulaciones 8-1 y 8-2.

Tabla 46: Resultados de la detección de sustancias relacionadas para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 5	Día 12	Día 20	Día 27	Día 53
8-1	3	2,29	3,05	6,03	9,28	14,66	25,57
8-2	48	2,19	3,23	4,28	5,41	6,88	8,47
8-3	3	2,25	2,85	3,50	3,85	5,32	7,66
8-4	48	2,19	2,90	3,56	4,23	6,13	9,04

En la Tabla 46, se puede ver que: la estabilidad de la formulación 8-3 es significativamente superior a la de la formulación 8-1. La estabilidad de la formulación 8-4 es superior o comparable a la de la formulación 8-2.

8.3 Detección de HMWP

De forma similar a la Sección 8.2, el aumento de las HMWP en relación con el día 0 se midió a 4 °C, 25 °C y 37 °C para cada formulación en el Ejemplo 3. Los resultados de las pruebas se muestran en las Tablas 47, 48 y 49, respectivamente.

Tabla 47: Resultados de la detección de HMWP para formulaciones del compuesto 1 en condiciones prolongadas a 4 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 27	Día 53
8-1	3	0,32	0,38	0,33
8-2	48	0,29	0,35	0,42
8-3	3	0,30	0,35	0,44
8-4	48	0,34	0,40	0,40

En la Tabla 47, se puede ver que: las tendencias de cambio en las HMWP fueron esencialmente consistentes en todos los grupos durante el almacenamiento prolongado a 4 °C. Básicamente no hubo diferencias en las tendencias de estabilidad (cambios en el contenido de HMWP) entre las diferentes formulaciones del compuesto 1 durante el período de almacenamiento de 53 días a 4 °C.

Tabla 48: Resultados de la detección de HMWP para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 25 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 27	Día 53
8-1	3	0,32	0,74	1,08
8-2	48	0,29	1,02	1,65
8-3	3	0,30	0,39	0,50
8-4	48	0,34	0,50	0,57

En la Tabla 48, se puede ver que: en comparación con las formulaciones 8-1 y 8-2, las formulaciones 8-3 y 8-4 demuestran una estabilidad significativamente superior.

Tabla 49: Resultados de las HMWP en experimentos comparativos para formulaciones del compuesto 1 en condiciones aceleradas a 37 °C

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 5	Día 12	Día 20	Día 27	Día 53
8-1	3	0,32	0,78	1,93	3,83	5,38	10,03
8-2	48	0,29	0,86	2,04	1,52	1,81	2,18

Formulación No.	Compuesto 1 (mg/ml)	Día 0	Día 5	Día 12	Día 20	Día 27	Día 53
8-3	3	0,30	0,38	1,40	0,52	0,61	0,92
8-4	48	0,34	0,42	0,45	0,82	1,21	1,77

En la Tabla 49, se puede ver que: la estabilidad de las formulaciones 8-3 y 8-4 es significativamente superior a la de las formulaciones 8-1 y 8-2.

Secuencias:

SEQ ID NO.1:

Péptido GLP-1-(7-37)

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly

SEQ ID NO.2:

Péptido [Gly8, Arg34]GLP-1-(7-37)

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly

La presente invención se ha descrito mediante los ejemplos anteriores, pero debe entenderse que son solo para fines ilustrativos y no tienen la intención de limitar la presente invención al alcance de los ejemplos descritos. Además, los expertos en la materia apreciarán que la presente invención no se limita a los ejemplos anteriores. Se pueden realizar variaciones y modificaciones adicionales basadas en las enseñanzas de la presente invención, y dichas variaciones y modificaciones se encuentran dentro del alcance de protección reivindicado en el presente documento. El alcance de protección de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.